



Utredning av erythrocytavvikelsen skistocytos

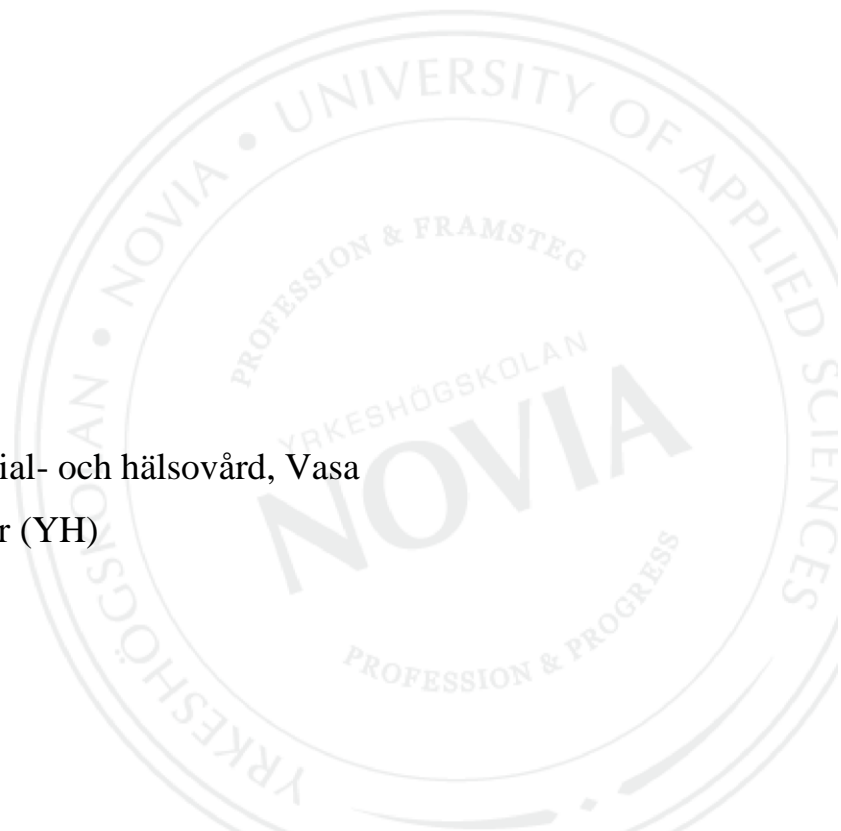
Sofie Ingves

Tanya Mäkelä

Examensarbete inom social- och hälsovård, Vasa

Utbildning: Bioanalytiker (YH)

Vaasa / 2015



EXAMENSARBETE

Författare: Tanya Mäkelä & Sofie Ingves

Utbildning och ort: Bioanalytiker, Vasa

Handledare: Margareta Antus, Jukka Salminen & Susanne Smeds

Titel: Utredning av erythrocytavvikelsen skistocytos

Datum: 1.12.2015

Sidantal: 47

Bilagor 3

Abstrakt

Med denna studie har målet varit att ta reda på om den automatiska cellräknaren Sysmex XE-5000 kan användas som sällningsinstrument i samband med skistocyträkning. I blodet finns tre olika blodcellstyper dessa är leukocyter, erytrocyter och trombocyter. Vid olika sjukdomstillstånd kan det förekomma olika morfologiska avvikelser hos erythrocyterna. En av dessa avvikelser är skistocytos som ger sig till känna vid till exempel trombotisk trombocytopen purpura och hemolytiskt uremiskt syndrom.

Syftet med studien var att jämföra den automatiska cellräknaren Sysmex XE-5000 skistocytprocent (FRC%) med den manuella mikroskoperingens skistocytprocent. Målet var att ta reda på om man i rutinarbetet kunde använda sig av den automatiska cellräknarens FRC% istället för den manuella mikroskoperingen, som kräver erfarenhet och tid.

Studien har genomförts genom att proverna först analyserades på den automatiska cellräknaren Sysmex XE-5000 och sedan bedömdes proven i mikroskop. Den automatiska cellräknarens resultat och det mikroskop bedömda svaret jämfördes statistiskt.

Resultatet av studien visar att man kan använda den automatiska cellräknaren Sysmex XE-5000 för att sälla bort negativa resultat, med en FRC% (skistocytprocent) under 0,5. Sysmex hade dock en tendens att överskatta skistocytantalet och därför bör positiva resultat med en FRC% (skistocytprocent) över 0,5 alltid mikroskopas.

Språk: Svenska

Nyckelord: Skistocytos, automatisk cellräknare, erythrocytavvikelse, metodjämförelse, FRC%

OPINNÄYTETYÖ

Tekijät: Tanya Mäkelä & Sofie Ingves

Koulutus ja paikkakunta: Bioanalytiikko, Vaasa

Ohjaajat: Margareta Antus, Jukka Salminen & Susanne Smeds

Nimike: Skistosytoosin tutkiminen

Päivämäärä: 1.12.2015

Sivumäärä: 47

Liitteet: 3

Tiivistelmä

Opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää voidaanko seulontavälineenä skistosyytilaskennan yhteydessä käyttää automaattista solulaskijaa Sysmex XE-5000. Verestä löytyy kolme eri verisolutyyppeä, näitä ovat leukosyytit, erytrosyytit ja trombosyytit. Erilaisissa tautitiloissa voi esiintyä erilaisia poikkeavuuksia erytrosyyttien morfologiassa. Yksi näistä poikkeavuuksista on skistosytoosi, joka ilmenee esimerkiksi tromboottisessa trombosytopenisisessä purppurassa ja hemolyytisessä ureemisessä oireyhtymässä.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli vertailla automaattisen solulaskijan Sysmex XE-5000:n ja manuaalisen mikroskopoinnin skistosyyttiprosenttia (FRC %) keskenään. Tavoitteena oli selvittää, voisiko rutiinityössä käyttää automaattisen solulaskijan skistosyyttiprosenttia (FRC %), paljon kokemusta ja aikaa vaativan manuaalisen mikroskopoinnin sijaan.

Selvitys toteutettiin ensin analysoimalla näytteet automaattisella solulaskijalla Sysmex XE-5000:lla ja sen jälkeen tarkastelemalla näytteet mikroskoopilla. Tilastollisilla menetelmillä pystyttiin vertailemaan automaattisen solulaskijan antamia tuloksia ja manuaalisella mikroskopoinnilla arvioituja tuloksia.

Opinnäytetyön tulos osoittaa, että automaattista solulaskijaa Sysmex XE-5000 voidaan käyttää negatiivisten tulosten karsinnassa, jossa FRC % (skistosyyttiprosentti) on alle 0,5. Sysmexillä oli kuitenkin taipumusta skistosyyttimäärän yliarvioimiseen ja siksi FRC% olleessa yli 0,5 pitäisi aina mikroskopoida.

Kieli: Ruotsi

Avainsanat: Skistosytoosi, automaattinen solulaskija, punasolupoikkeavuus, menetelmävertailu, FRC%

BACHELOR'S THESIS

Authors: Tanya Mäkelä & Sofie Ingves

Biomedical Laboratory Scientist, Vaasa

Supervisors: Margareta Antus, Jukka Salminen & Susanne Smeds

Title: Unraveling the erythrocyte alteration schistocytosis

Date: 1.12.2015

Number of pages 47

Appendices: 3

Abstract

With this study the main goal was to find out if the automatic cell counter Sysmex XE-5000 can be used as a screening instrument for schistocyte count. There are three different blood cell types in the blood, and these are leukocytes, erythrocytes and platelets. In different disease conditions there may be different morphologic abnormalities in erythrocytes. One of these abnormalities is schistocytosis, which manifests itself for example in thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndrome.

The aim of the study was to compare the automated cell counter Sysmex XE-5000 schistocyte percentage (FRC %) with the manual microscopic schistocyte count. The goal was to find out if the automated cell counters FRC % could be used in the routine work instead of the manual microscopy, which requires experience and time.

The study was accomplished by first analyzing the samples on the automated cell counter Sysmex XE-5000 and then the samples were assessed under the microscope. The results from the automatic cell counter and the results from the microscopic assessment were compared by statistical analysis.

The results of the study show that the automated cell counter Sysmex XE-5000 can be used to rule out negative results, with a FRC % (schistocyte percentage) below 0.5. Sysmex, however, had a tendency to overestimate the schistocyte count and therefore positive results with a FRC % (schistocyte percentage) over 0.5 should always be assessed under the microscope.

Language: Swedish

Key words: Schistocytosis, automatic cell counter, abnormal erythrocyte, method comparison, FRC%

Innehållsförteckning

1 Inledning	1
2 Syfte	2
3 Teoretisk bakgrund	2
3.1 Blodet	3
3.1.1 Erythrocyter	4
3.1.2 Erytropoesen och erythrocytens uppgifter	4
3.2 Erythrocytavvikelsen skistocytos	7
3.3 Förekomst av skistocyter vid olika tillstånd	10
3.3.1 Skistocyter och stamcellstransplantation	10
3.3.2 Trombotisk trombocytopen purpura och hemolytiskt uremiskt syndrom	11
3.4 Preanalytik inför blodprovstagning	12
3.4.1 Patientförberedelse	12
3.4.2 Provtagning och hantering	13
3.5 Blodprovstagning	14
3.6 Anvisningar för perifert blodutstryk	16
3.7 Den automatiska cellräknaren Sysmex XE-5000	18
4 Tidigare forskning	20
4.1 Utvärdering av Sysmex XE-5000 FRC-räkning	20
4.2 Forskning om bedömning av skistocyter med automatiska blodcellsräknare	21
4.3 Bedömning av skistocyter med den automatiska cellräknaren AVIDA jämfört med manuell mikroskopering	21
5 Material och metoder	23
5.1 Metoder för undersökningen	23
5.2 Metoder för datainsamling	24
5.3 Metoder för dataanalys	24
5.3.1 Passing-Bablok regressionsanalys	25
5.3.2 Bland-Altman plot	25
5.3.3 Kappakoefficient	26
5.4 Kvalitetsparametrar	28
5.4.1 Mätfel och Mätosäkerhet	29
5.4.2 Precision, repeterbarhet och reproducerbarhet	29
5.4.3 Sensitivitet och specificitet ur mätteknisk och diagnostisk synvinkel	30
6 Undersökningens genomförande	31

6.1 Undersökningens praktiska genomförande	31
6.2 Mikroskopering av skistocyter	32
6.3 Sysmex XE-5000 FRC%	34
7 Resultat redovisning och tolkning	36
7.1 Tolkning med hjälp av Passing-Bablok regressionsanalys.....	36
7.2 Tolkning med hjälp av Bland-Altman plot.....	38
7.3 Tolkning med hjälp av Kappakoefficient	39
8 Kritisk granskning och diskussion.....	40
Litteraturförteckning.....	44

Bilagor

Bilaga 1	Tabell över rådata från Microsoft Excel
Bilaga 2	Utarbetade anvisningar för mikroskopisk skistocyträkning
Bilaga 3	Vasa centralsjukhus arbetsbeskrivning för E-Fragm

1 Inledning

I Finland görs årligen miljontals blodbildsundersökningar för att kartlägga cellerna i blodet. I Finland beställs laboratorieundersökningarna liten blodbild med trombocyter (B-PVK+T) och fullständig blodbild (B-TVK). I undersökningen liten blodbild ingår delundersökningarna hemoglobin i blodet, hematokritvärdet, trombocyt mängden, leukocyt mängden, erytrocyt mängden, erytrocyternas medelcellvolym (MCV), medelcellhemoglobin (MCH) och erytrocyternas medelhemoglobinkoncentration (MCHC). Till den fullständiga blodbilden hör förutom dessa delundersökningar även en differentialräkning av leukocyter. I normala fall utförs undersökningarna av en automatisk cellräknare, men när den automatiska cellräknaren inte kan klassificera blodcellerna behövs även en mikroskopisk bedömning av det perifera blodutstryket (Sinisalo & Koski, 2010, s. 2857 – 2859).

Det perifera blodet består till stor del av erytrocyter. Erytrocyternas främsta uppgift i kroppen är att transportera syre från lungorna till resten av kroppen och samtidigt transportera koldioxid från kroppen till lungorna. Erytrocyterna kan variera i form, färg och storlek (Harmening & Jones eds, 2009, s. 96). Den erytrocytavvikelse vi kommer att ta fasta på är fragmenterade erytrocyter, skistocyter. Dessa är mekaniskt skadade erytrocyter. Begreppen fragmenterade erytrocyter och skistocyter används parallellt. I respondenternas studie används i fortsättningen främst begreppet skistocyt.

Skistocyter är erytrocytfragment som kan ses i blodutstryk. Identifiering av skistocyter är svårt och de systematiska avvikelserna bland observatörerna är svåra att eliminera, eftersom mikroskopering av skistocyter i praktiken är tidskrävande och saknar standardisering. Kriterier för skistocyternas bedömning är fortfarande inte slutligt fastställda (Leseve, et.al., 2011, s. 344; Leseve, et.al., 2004, s.739; Leseve & Salignac & Lecompete, 2007, s.149)

I nuläget håller Vasa centralsjukhus laboratorieenheten för klinisk hematologi på att ta i bruk undersökningen 8368 E-Fragm som referensmetod för räkning av skistocyter i perifert blodutstryk. Vårt examensarbete är ett beställningsarbete från klinisk hematologi för att ta reda på om den automatiska cellräknaren Sysmex XE-5000 kan ersätta denna analysmetod.

2 Syfte

Syftet med vårt examensarbete är att ta reda på om den automatiska cellräknaren Sysmex XE-5000 kan ersätta den manuella metoden för mikroskopering av skistocyter i blodutstryk för analysen E-Fragm. För att undersöka detta måste respondenterna först ta reda på vilka kriterier en skistocyt bör uppfylla för att räknas som skistocyt enligt den automatiska cellräknaren Sysmex XE-5000. Respondenterna måste även sammanställa kriterierna för skistocyträkning vid mikroskopisk bedömning av perifert blodutstryk.

Om respondenterna lyckas fastställa dessa kriterier och kommer fram till att den automatiska cellräknaren kan ersätta den nuvarande mikroskopiska bedömningen underlättas arbetet vid klinisk hematologi. Analysprocessen förkortas då genom att tidskrävande steg såsom färgning av blodutstryk elimineras. Vid analys på den automatiska cellräknaren elimineras risken att laboratoriepersonalen bedömer skistocyter felaktigt vid mikroskopisk bedömning av perifert blodutstryk.

Respondenternas frågeställningar är:

Vilka kriterier bör en erytrocyt uppfylla för att bedömas som en skistocyt enligt internationella kriterier?

Vilka kriterier har den automatiska cellräknaren Sysmex XE-5000 för att en erytrocyt skall räknas som en skistocyt?

Kan mikroskopisk bedömning av skistocyter i perifert blodutstryk ersättas av resultatet från den automatiska cellräknaren Sysmex XE-5000 för räkning av skistocyter?

3 Teoretisk bakgrund

I detta kapitel tar respondenterna upp blodets beståndsdelar, erytrocyten och dess utveckling, vikten av preanalytik vid blodprovstagning, själva blodprovstagningen, den automatiska cellräknaren Sysmex XE-5000, skistocyter samt sjukdomar som kan ge upphov till denna erytrocytavvikelse.

3.1 Blodet

Blodet ingår i kroppens blodomlopp tillsammans med två andra enheter, hjärtat och blodådrorna. Blodets uppgift i kroppen är att transportera olika substanser, reglera olika processer i kroppen och skydda människan från sjukdom. Blodet är en flytande vävnad som består av blodplasma, extracellulär vätska, och fasta element (celler och cellfragment). Med en fördelning på cirka 45 % fasta element, bestående till 99 % av erythrocyter och 1 % av leukocyter och trombocyter, och cirka 55 % blodplasma. Blodplasma (plasma) består av cirka 91,5 % vatten och cirka 8,5 % proteiner, dessa proteiner kallas plasmaproteiner och kan vara bland annat albumin, fibrinogen, och antikroppar (Tortora & Derrickson, 2012, s. 728-731). Ungefär 92 % av plasman utgörs av vatten. Därför är plasman en utmärkt transportväg för organiska och oorganiska substanser som är vattenlösliga, men även för plasmaproteinerna som är svårlösliga i vatten. Plasmaproteinerna fungerar även som transportörer för andra substanser, såsom fettsyror och hormoner (Sand & Sjaastad & Haug & Bjålie, 2006, s.316).

De fasta elementen i blodet består av erythrocyter, leukocyter och trombocyter. Erythrocyter och leukocyter är hela celler medan trombocyterna är cellfragment. Leukocyterna kan även vidare klassificeras in i grupper utefter deras specifika uppgift och utseende (Tortora & Derrickson, 2012, s.731).

De olika grupperna av leukocyter har alla sina specifika uppgifter i kroppens försvarssystem. Till skillnad från erythrocyterna, som utför sina uppgifter i blodet, använder leukocyterna blodet som en transportväg till ställen i kroppen där det uppstått en inflammation eller infektion. Då en allvarlig infektion uppkommer frisätts lagrade leukocyter till blodet, så att antalet leukocyter snabbt och effektivt ökar i blodet. Samtidigt ökar produktionen av leukocyter så att den ökade nivån i blodet kan upprätthållas (Sand, et.al., 2006, s.322).

Trombocyterna bildas i benmärgen från megakaryocyterna. Trombocyterna är cellfragment av megakaryocyternas cytoplasma, vilket förklarar varför trombocyterna saknar kärna och förmågan att dela sig. Trombocyterna lämnar aldrig blodkärlen och har en livslängd på cirka 10 dygn, varefter de bryts ner av makrofager (Sand, et.al., 2006, s.325). Trombocyterna spelar en viktig roll vid blodförlust, då de har en förmåga att bilda trombocytpluggar för att förhindra blödning. Trombocytpluggarna förseglar hålen i blodkärlen och frisätter ämnen som hjälper till vid blodkoagulering (Peate & Nair, 2015, s.13).

3.1.1 Erythrocyter

Erythrocyter, eller även kallade röda blodkroppar, bildas i benmärgen utifrån den hemapoe-tiska stamcellen som ger upphov till alla blodceller. Dessa stamceller garanterar den konti-nuerliga konstanta nyproduktionen av blodceller, genom bildningen av förstadier och omogna blaster som senare delar sig och utmognas. För att klara av detta måste stamcellen ha en självförnyelseförmåga för att inte ta slut och en repopulationsförmåga för att fungera optimalt (Gahrton & Juliusson, 2012, s. 21).

Erythrocyten lever i cirkulationssystemet i cirka 120 dagar, vilket betyder att cirka tre miljo-ner erythrocyter dör och destrueras i mjälten per sekund. Detta betyder då även att kroppen producerar cirka tre miljoner erythrocyter per sekund för att upprätthålla balansen. Erythrocy-terna utsätts för stort slitage i cirkulationssystemet när dessa pressas genom kapillärer och stöts mot blodkärlsväggar. Erythrocyterna saknar både DNA och RNA, vilket betyder att de inte kan producera proteiner som reparerar cellskador. Mogna erythrocyter saknar även cell-kärna vilket betyder att all produktion sker i benmärgen (Gahrton & Juliusson, 2012, s. 26; Sand, et.al., 2006, s. 318).

Kroppens produktion av blodkroppar kallas hematopoes och börjar redan i fosterstadiet. Pro-duktionen av alla de mogna blodcellerna, erythrocyter, leukocyter och trombocyter, är starkt reglerad av den koncentration som redan finns. För denna produktion behövs en fri tillgång av stamceller och progenitorer samt tillväxtfaktorer, cytokiner, som signalerar behovet av utmognaden. Kroppens bildning av erythrocyter kallas erytropoes (Gahrton & Juliusson, 2012, s. 25; Sand, et.al., 2006, s. 318).

3.1.2 Erytropoesen och erythrocytens uppgifter

Erythrocyter saknar kärna och kan därför inte dela sig på egen hand utan produktionen av erythrocyter hos vuxna sker i benmärgen i platta ben som revbenen, bröstbenet och bäcken-benet. Hos barn sker produktionen av erythrocyter i rörbenen som senare ersätts med fettväv-nad och produktionen centreras till revbenen, bröstbenet och bäckenbenet. För foster sker

produktionen av erythrocyter huvudsakligen i mjälten och i levern, men i slutet av fosterstadiet övergår produktionen till benmärgen. Nybildningen av erythrocyter utgår från en persons kroppsvikt, det bildas cirka 3×10^9 erythrocyter per kilogram dagligen (Sand, et.al., 2006 s. 318; Gahrton & Juliusson, 2012, s. 25).

Erythrocyten utmognas från den hemapoetiska stamcellen till common myeloid progenitor vidare till erythroid progenitor. Under dessa skeden kan man inte urskilja erythrocyten från de andra cellinjerna. I nästa mognadsskede till proerytroblast, kan man morfologiskt känna igen att cellen håller på att utvecklas till en erythrocyt. Proerytroblasten kan genom upprepad delning ge upphov till hela 16 erythrocyter, dock dör en del celler under processen (kallas ineffektiv erythropoes). Denna morfologiskt igenkännbara cell är en relativt stor cell med en volym på 10-15 μL men i samband med celldelningen minskar storleken. Utmognaden till nästa cellskede heter erytroblast. Denna cell kan även indelas i tre olika utvecklingsskeden. Dessa är basofil erytroblast, polykromatisk erytroblast och ortokromatisk erytroblast (i kronologisk ordning) (Gahrton & Juliusson, 2012, s. 25 – 26 s. 22; Rodak & Carr, 2013, s. 13; Sand et.al., 2006, s. 317).

Under utvecklingen från erytroblast till retikulocyt minskar cellens volym till en utmognad erythrocyts storlek (cirka åtta μL). Kärnan kondenseras och kastas ut ur cellen. Retikulocyterna, även kallad polykromatisk erythrocyt, har ännu kvar ribosomalt RNA i sig och vid en speciell färgning och mikroskopiering av cellen kan detta synas. Dock ses inte dessa hos friska individers blodutstryk. Retikulocyterna utgör endast en par procent av erythrocyterna i blodbanan och dessa celler är på väg till mjälten för att genomgå det sista utmognadssteget innan de kommer tillbaka ut i blodbanan som mogna erythrocyter. Tiden det tar för erythrocyter att mogna från erytroblast är cirka fyra till fem dagar och den mogna erythrocyten lever i cirka 120 dagar före den destrueras i mjälten (Gahrton & Juliusson, 2012, s. 25 – 26 s. 22; Rodak & Carr, 2013, s. 13; Sand et.al., 2006, s. 317).

Under mognadsprocessen från erytroblast till erythrocyt sker den viktiga syntesen av hemoglobin. Hos proerytroblaster och basofila erytroblaster är RNA-syntesen som störst och upphör sedan helt hos ortokromiska erytroblaster. ALA-syntetasaktiviteten, som gör att hem produceras, är till en början låg men ökar i den polykromatiska erytroblasten och är som störst hos ortokromiska erytroblaster, detta samtidigt som hemoglobin produktionen når sitt maximum. Järnupptaget i erythrocyterna sker till cirka en tredjedel under retikulocytstadiet och två tredjedelar under erytroblaststadierna och når sitt maximum hos de ortokromiska erytroblasterna under den intensiva hemoglobinsyntesen som sker i detta cellstadium. Det är

hem som reglerar både transkriptionen av mRNA:t för globinkedjorna och ALA-syntetasaktiviteten vilket gör att hem och globin är synkroniserade. Cellmembranet genomgår en omstrukturering samtidigt som hemoglobinprocessen framskrider inuti cellen, denna omstrukturering ger erytrocyten dess formbarhet och sin bikonkava form som behövs när den tränger sig ut ur benmärgen och för att kunna nå trånga perifera kapillärer (Gahrton & Juliusson, 2012, s.26; Sand et.al., 2006, s. 317).

Regleringen av erytropoesen styrs till stor del av glykoproteinet erythropoetin, Epo, som bildas i levern hos foster och till största delen i njurarna hos vuxna. Epos existens upptäcktes redan på 1950-talet, men först under 1980-talet kunde man börja producera artificiella mängder av Epo som var kliniskt användbara. Epo, som är ett surt glykoprotein med 166 aminosyror och med en molekylvikt på cirka 34 kD, klassificeras mera som en hormon än en cytokin. Epo bildas av celler som finns i njurarna. När vävnaden sträcks mindre börjar cellerna producera mera Epo eftersom sträckningen beror på hur mycket syrgas som finns kring cellen samt att andra hormoner kan påverka produktionen, till exempel östrogen minskar produktionen och testosteron ökar produktionen av Epo. Om syretransporten till njurarna skulle minska ökar produktionen av Epo, vilket i sin tur ökar nybildningen av erytrocyter. Från att njurarna börjar producera mera Epo och det kommer ut i blodomloppet tar det cirka en till två dagar före man kan registrera ett ökat antal erytrocyter i blodet (Gahrton & Juliusson, 2012, s.26 – 27; Sand et.al., 2006, s. 319 – 321).

Som tidigare nämnts lever erytrocyterna i cirka 120 dagar i cirkulationssystemet. Efter denna tid har cellmembranen blivit så skadad att den mist sin elasticitet och lätt brister eller skadas när cellen tränger sig genom kapillärer. I mjälten har man extra trånga kapillärer och ofta brister erytrocyterna där. De döda erytrocyterna bryts ner av makrofager som finns i mjälten, benmärgen och levern. Makrofagerna avspjälkar järn och globindelen, det mesta av järnet återanvänds till nybildningen av erytrocyter. Resten av hemgruppen ombildas till bilirubin som levercellerna tar upp och utsöndrar med gallan. När bilirubinet utsöndrats till tarmen omformas det av bakterier till färgämnen som färgar avföringen brun och urinen gul (Sand et.al., 2006, s. 321).

Erytrocyternas främsta uppgift är att transportera syre, O_2 , och koldioxid, CO_2 , i kroppen. En hemoglobinmolekyl innehåller fyra hemgrupper som har varsin järnatom. Dessa järnatomer kan binda en syremolekyl var, en erytrocyt kan således transportera fyra syremolekyler. Med hjälp av hemoglobinet i erytrocyterna transporterar cellerna O_2 från lungorna ut till kroppen och tar sedan med sig CO_2 , tillbaka till lungorna för utandning och erytrocyten binder nya

syremolekyler till sig. O₂ binder till hemoglobinet järn del medan CO₂ binder till proteindelen, bindningen av CO₂ sker lättare om O₂ har avgetts. Detta betyder alltså att när O₂ avges från hemoglobinmolekylens järn del i kapillärer ökar molekylens förmåga att binda CO₂ för transporten tillbaka till lungorna. Det som styr över hur mycket O₂ som transporteras ut i kroppen är hemoglobinkoncentrationen i blodet, hemoglobinet mättningsgrad och hjärtats minutvolym. Om erytrocyt antalet minskar försämras även blodets förmåga att transportera syre och om erytrocyt antalet ökar blir blodet tjockare och hjärtat får ökad belastning (Sand et.al., 2006, s 317 & s. 370 – 372; Hoffbrand & Moss, 2011, s. 19 – 20).

3.2 Erytrocytavvikelsen skistocytos

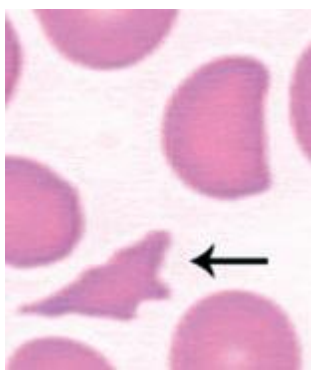
Skistocyter är cirkulerande fragment av erythrocyter eller erythrocyter som mist delar av sitt cytoplasma. Skistocyter uppkommer ofta som en följd av mekanisk skada eller onormala strukturer i hjärtat och de stora kärlen, till exempel på grund av en hjärklaffprotes som inte fungerar optimalt. Sådan mekanisk skada på erythrocyternas membran uppkommer på grund av fibrintrådar på endotelytan och/eller en onormal turbulens i blodet (Leseve, et.al., 2004, s. 739 – 745; Chalvatzi & Spiroglou & Nikolaidou & Diza, 2013, s. 139 – 199). Den skadade cellen fortsätter att cirkulera i blodomloppet medan den försöker läka sina skador, men kommer så småningom att avlägsnas i mjälten. Skistocyter kan även uppkomma vid brännskador på grund av att temperaturhöjningen skadar erythrocyternas membran. Onormalt cytoskelett och av ömtåligt erythrocytmembran kan även ge upphov till skistocyter dessa kan vara genetiska eller förvärvade (Zini, et.al., 2012, s. 107 – 116).

Förekomsten av skistocyter i blodet anses avvikande. Dock kan skistocyter även ses hos friska individer, men den genomsnittliga procenten ligger på 0,10–0,20 % (Leseve et.al., 2007, s. 149-151). Nyfödda kan även normalt ha en högre procent skistocyter, upp till 1,4–1,9 %, och prematurer har i allmänhet ännu högre procent skistocyter, upp till 4,9–5,5 % (Zini et.al., 2012, s. 107 – 116). Skistocyter i blodet kan tyda på en möjlig trombotisk mikroangiopati (TMA) men även på andra tillstånd såsom mekanisk hemolytisk anemi till följd av hjärklaffssjukdom eller en felfungerande hjärklaffprotes, komplikationer vid graviditet och förlossning (preeklampsi och eklampsi), brännskador, metastatisk cancer, megaloblastisk

anemi, sepsis, disseminerad intravasal koagulation (DIC) (Huh & Chung & Chae, 2013, s.543) och antifosfolipidsyndrom (CAPS) (Vierregge et.al., 2013).

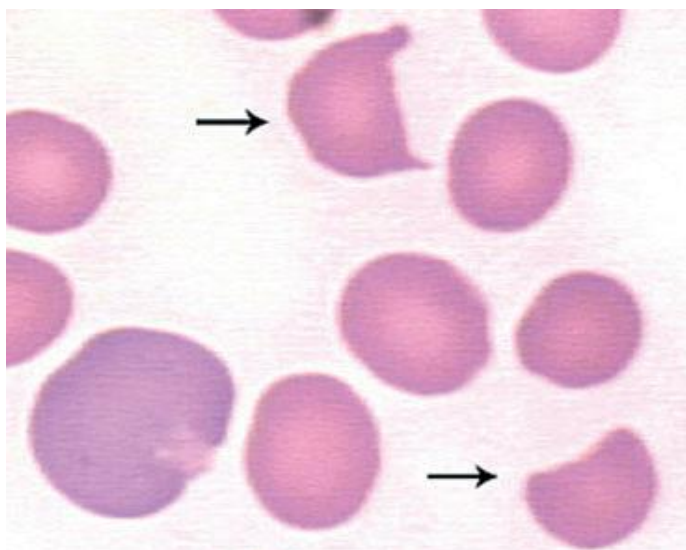
International Council for Standardization in Hematology (ICSH) har bildat en arbetsgrupp, the Schistocyte Working Group, som getts i uppgift att utforma rekommendationer för mikroskopiering av skistocyter. Enligt ICSH är skistocyter alltid mindre än intakta erythrocyter och följande fragment räknas: triangelformade erythrocyter, halvmåneformade, hjälmformade erythrocyter (*helmet cells*) med en amputerad zon, keratocyter och mikrosfärocyter. Dock räknas mikrosfärocyter endast om föregående skistocytformer kan observeras, dessa räknas alltså inte om de är ensamt förekommande eller enda förekomsten som hittas i utstryket (Zini, et.al., 2012, s.107 – 116).

Följande celler räknas som skistocyter. Små erythrocytfragment med varierande utseende som kan vara triangelformade som har skarpa vinklar eller utskott och raka kanter (se figur 1) eller halvmåneformade (mindre än sickleceller) som har en rund kontur och är ofta förvrängda. Dessa små fragment färgas ofta mörkare vid färgningen men kan även ibland vara bleka till färgen som ett resultat av förlust hemoglobin vid cellfragmentationen.



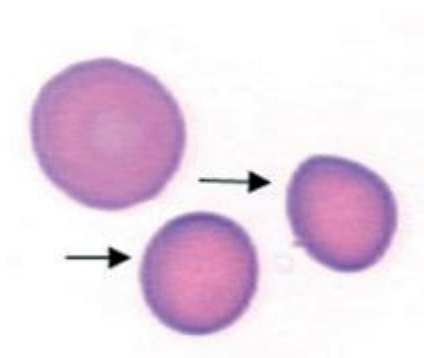
Figur 1. Pilen visar på en triangelformad skistocyt (Zini, et.al., 2012).

Hjälmformade erythrocyter (*helmet cell*) med en eller ibland dubbel amputerad ljusare zon och en rak kant som ofta har spetsiga utskott (se figur 2). Skadade celler större än små erythrocytfragment som har två eller flera utskott som separeras av ett konkavt halvcirkelformat segment av membranet, även kallade keratocyter (se figur 2). Dessa celler har uppkommit genom att perifera pseudovakuoler funnits i erythrocyten och brustit och på grund av detta har keratocyters kännetecknande horn uppkommit.



Figur 2. Den övre pilen visar på en keratocyt och den nedre pilen visar på en hjälmformad skistocyt (Zini, et.al., 2012).

Små kompakta runda erythrocyter med stark färgning kallas mikrosfärocyter eller sfäroskistocyter (se figur 3). Dessa celler saknar en ljusare zon i mitten. Cellerna uppkommer efter en bristning i membranen som leder till membranytan minskar i förhållande till cytoplas mavolymen. Mikrosfärocyterna kan ses i utstrykets svans då övriga skistocyter har en tendens att bli runda vid utstrykningen. Dock ska mikrosfärocyter endast räknas om det även hittas de andra typerna av skistocyter på blodutstryket (Zini et.al., 2012, s. 107 – 116).



Figur 3. Pilarna visar på två mikrosfärocyter (Zini, et.al., 2012).

3.3 Förekomst av skistocyter vid olika tillstånd

Skistocyter kan ses i blodutstryk hos patienter med sjukdomar eller tillstånd som leder till vaskulära endotelcellsskador, såsom trombotisk mikroangiopati (TMA), hemolytiskt uremiskt syndrom (HUS), trombotisk trombocytopen purpura (TTP) och stamcellstransplantation som tas upp närmare nedan. Enligt Abe et al.'s studie (2009, s. 257 – 262) har man normalt en FRC% på 0,04 medan man vid olika sjukdomstillstånd har en signifikant ökning. Till exempel ligger FRC% medeltalet på ~2,49 vid TMA, på ~2,40 vid stamcellstransplantation och på ~4,91 vid TTP.

3.3.1 Skistocyter och stamcellstransplantation

Det är vanligt att man hittar skistocyter i det perifera blodutstryket efter man genomgått en stamcellstransplantation, man hittar vanligen skistocyter i blodutstryket under sex veckor efter benmärgstransplantation. Efter en stamcellstransplantation finns risk att få olika följsjukdomar, till exempel trombotisk mikroangiopati, dessa har man kunnat associera med högt antal skistocyter efter transplantationen samt svårighetsgraden av följsjukdomen (Leseve et.al., 2011, s. 343 – 353).

Leseve et al.(2011, s. 343 – 346) har gjort en studie med 195 patienter som genomfört stamcellstransplantation under fem års tid. De mikroskoperade blodutstryk av patienterna minst två gånger i veckan. Studien visade att 93 % av de 125 patienter som genomgått allo-gen stamcellstransplantation och fått stamceller från en annan givare hade värden över 0,5 % två månader efter transplantationen samt att åtminstone 97 % av patienterna hade skistocyter i blodet. Patienterna med hematologiska cancerformer hade även högre skistocytprocent än patienter med tumörer.

3.3.2 Trombotisk trombocytopen purpura och hemolytiskt uremiskt syndrom

Termen trombotisk mikroangiopati (TMA) används främst för sjukdomsgruppen trombotisk trombocytopen purpura (TTP) och hemolytiskt-uremiskt syndrom (HUS). Ibland används termerna TTP och HUS som ett gemensamt begrepp för att beskriva samma tillstånd på grund av de många gemensamma dragen. Gemensamt för dessa tillstånd är en ökad förekomst av von Willebrandsfaktorn, som har en trombocytaktiverande egenskap. Detta beror på ett bortfall av serum-metalloproteinaset ADAMTS13 som har som uppgift att klyva enorma multimerer av von Willebrandsfaktorn. Dessa stora multimerer binder lättare till trombocyterna än de mindre multimererna och följden kan bli att blodproppar bildas. Om enzymet ADAMTS13 saknas cirkulerar de stora VWF-multimererna i plasma. Detta är den centrala mekanismen vid uppkomst av TTP/HUS (Gharton & Juliusson, 2012, s.229 – 230 & s. 319 – 320; Rahman, et.al., 2013, s.141 – 146).

Karaktäristiskt för TTP är att det bildas intravaskulära mikrotromber. Mikrotromberna bildas när trombocyterna adhererar och aggregerar. Som en följd av bristen på ADAMTS13, uppstår utfällning av fibrintrådar i mikrocirkulationen. På grund av detta trasas erytrocyterna sönder och skistocyter eller erytrocytfragment uppstår. Därför är skistocyter i blodutstryket närmast ett krav för diagnosen TTP. Dock är mikrosfärocyter ovanliga fynd vid TTP. Men även ett litet antal skistocyter i blodutstryket är viktigt att lägga märke till, speciellt vid oförklarlig anemi och trombocytopeni, då det kan vara en indikation på TTP. Mikroangiopatisk hemolytisk anemi (MAHA) är också ett kliniskt tecken på TTP, men även trombocytopeni på grund av ökad destruktion, njurpåverkan, neurologiska symptom samt feber (Gharton & Juliusson, 2012, s.229 – 230 & s. 319 – 320).

TTP är ett kritiskt tillstånd som kan vara arvet eller förvärvat till följd av t.ex. läkemedelsbehandling, graviditet eller infektioner (främst orsakade av bakterierna *E.Coli* och *Shigella*-arter). Man har även kunnat se ett samband med HIV-infektion. Detta tillstånd är allvarlig och obehandlat finns risk för bestående skador och en hög dödlighet. Tillståndet behandlas ofta med stora mängder plasma (Gharton & Juliusson, 2012, s.229 – 230 & s. 319 – 320).

HUS liknar TTP mycket, men tillståndet är vanligast hos barn. Det främsta symptomet är njurskada, men även mikroangiopatisk hemolys samt trombocytopeni. De utlösande faktorerna tros vara de samma som vid TTP, men möjligtvis är tarminfektioner en vanligare utlösande faktor vid HUS. Behandlingen är densamma som vid TTP. TTP/HUS kan ibland

ses som komplikation efter stamcellstransplantation (Gharton & Juliusson, 2012, s.230 & s. 320).

3.4 Preanalytik inför blodprovstagning

Preanalytik är numera ett vanligt begrepp inom laboratoriediagnostiken. Eftersom kvaliteten på de vanligaste mätningarna numera är väldigt god, har man börjat lägga större fokus på de preanalytiska faktorerna. Med begreppet preanalytiska faktorer menas faktorer som kan påverka provet så att koncentrationen av den komponent som analyseras är annorlunda vid mätningen än vad den egentligen är hos patienten (Nilsson-Ehle & Berggren Söderlund & Theodorsson, 2012, s. 11 och s. 27).

Det finns många variabler som kan påverka resultatet av ett blodprov. Provtagning, hantering, förvaring och transport utgör den preanalytiska fasen, men även fysiologiska variabler så som kön och ålder kan ha stor inverkan på resultatet. De preanalytiska variablerna kan i stort sett delas in i tre grupper: fysiologiska variabler, provtagning och variabler som kan störa eller påverka mätningen. Till de fysiologiska variablerna hör bland annat kön, ålder, tidpunkt, livsstil, graviditet och menstruation. Till de preanalytiska variablerna vid provtagning hör till exempel. patientidentifiering, kroppsställning, märkning av provrör, användning av stas och fasta. Preanalytiska variabler som kan störa eller påverka mätningen är t.ex. lipemi, hemolys och antikroppar (Narayanan, 2000, s.429 – 447; Nilsson-Ehle, et.al., 2012, s. 11 & s. 25 – 27).

3.4.1 Patientförberedelse

Provresultaten jämförs med tidigare provresultat eller referensintervall. Därför är det viktigt att man följer samma tillvägagångssätt för att säkerställa jämförbara och tillförlitliga resultat. Patienten bör vara korrekt förberedd för de beställda blodproven. Till exempel fasta och vila är vanliga förberedelser. Patienten rekommenderas även vila i sittande ställning i 15 minuter före provtagning, för att stabilisera koncentrationen av ämnen i blodet. Till exempel kan

koncentrationen av proteiner och lipider minska med 5 – 15 % om provet tas av en sängliggande patient (Bölenius, 2014, s.10; Nilsson-Ehle, et.al., 2012, s.14 – 15).

Patientidentifikation kan innefatta själva identifikationen men även märkning av provrör och hantering av remisser. Patientidentifikation är en väldigt viktig preanalytisk faktor, eftersom misstag vid alla skeden av identifikationen kan leda till liknande konsekvenser, det vill säga felaktiga eller missade diagnoser, förväxling av patienter, felaktiga behandlingar eller till och med döden (Bölenius, 2014, s.11). Provtagningen bör alltid börja med en identifikation av patienten. Patienten uppger namn och personnummer själv, men kan även identifieras via identifikationsarmband. I vissa fall kan även släktingar identifiera patienten. Identiteten jämförs med remissernas patientuppgifter (Bölenius, 2014, s.11 – 12; Tuokko & Rautajoki & Lehto, 2008, s.10). Enligt Bölenius (2014, s. 11 – 12) står felmärkning av rören för 50–65 % av alla identifikationsproblem. Riktlinjerna för när proven ska märkas varierar mycket. Provrören bör märkas i nära anslutning till patienten (Matikainen & Miettinen & Wasström, 2010, s. 63 – 72).

3.4.2 Provtagning och hantering

Preanalytiska faktorer vid provtagning är till exempel provrör som inte fyllts tillräckligt, fel sorts provrör och en felaktig användning av stas. Stas används för att göra venerna mer synliga och lättare att lokalisera. Stasen ska öppnas så fort som möjligt efter lyckad venpunktion, dock ska stasen inte vara åtspänd längre än en minut. En för lång stasning kan påverka provresultaten, till exempel kan en ökning i kalium- och albuminnivåerna ses (Bölenius, 2014, s.12; Nilsson-Ehle, et.al., 2012, s.15).

Efter provtagningen bör man ta i beaktande flera preanalytiska faktorer. Till exempel koagulering, vändning/blandning av blodprov, felaktig förvaring och felaktig eller fördröjd centrifugering av blodprov är några av faktorerna som kan påverka blodprovets kvalitet och duglighet. Att använda rätt rör med rätt tillsatser för analysen i fråga är viktigt. Denna information framgår oftast i det lokala laboratoriets föreskrifter. Rör med tillsatser ska alltid vändas efter provtagningen, cirka 5–10 gånger. Dock kan för många vändningar av blodprovet öka risken för hemolys, medan ingen blandning ökar risken för koagulering. Efter provtagning

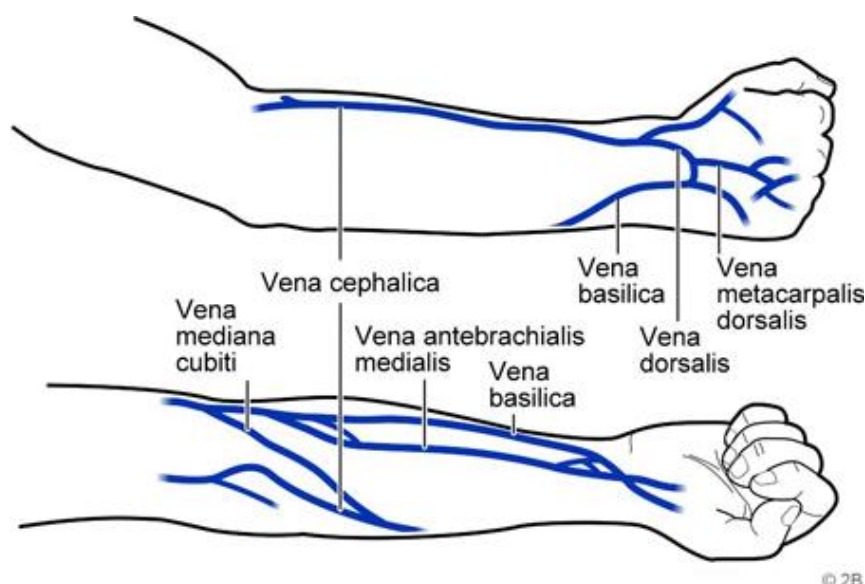
bör provrören stå vertikalt. Hur provet ska hanteras, förvaras och transporteras beror på analysen och tillsatserna i provröret och detta bör man kontrollera från laboratoriets provtagningsföreskrifter före provtagning (Bölenius, 2014, s.12 – 13; Nilsson-Ehle, et.al., 2012, s. 14 – 16; Tuokko, et.al., 2008, s. 10 – 12).

3.5 Blodprovstagning

Venprovtagning är det vanligaste sättet att ta blodprov. I Finland tas blodproven oftast av utbildad laboratoriepersonal, medan de i andra länder, till exempel i Sverige, kan tas av utbildade sjuksköterskor. Det viktigaste är dock att blodproven tas av utbildad och kompetent personal, så att man får blodprov av så bra kvalitet som möjligt (Bölenius, 2014, s.8).

Före påbörjande av provtagning bör provtagaren kontrollera att nödvändigt material finns tillgängligt. Det material som behövs för provtagning är remiss, provtagningsrör, nål och eventuell nålhållare, stas, handskar, desinfektionsmedel, kompress, plåster/tejp samt kärl för riskavfall. När patienten kallas in i rummet kontrolleras patientens identitet samt om patienten följt några speciella föreskrifter för provtagningen. Patienten bör sitta bekvämt i en stol med armstöd, eller eventuellt ligga bekvämt om provet tas på till exempel avdelning. Provtagaren desinfekterar händerna och tar på sig handskar, samt tar fram nödvändigt material och fäster nålen i nålhållaren om den inte är förmonterad. Patientens arm placeras lätt sluttande nedåt så att armen hålls på plats och venerna blir synligare. Eventuell stas appliceras och man letar efter lämpligt punktionsställe genom att känna efter med pek- eller långfinger. Vid svårigheter att hitta lämplig ven kan armen/handryggen värmas, eller också kan man be patienten att lätt knyta handen (Skov-Poulsen, 2015; Tuokko, et.al., 2008, s. 37 – 46; Matikainen, et.al., 2010, s. 63 – 72)

Vid val av punktionsställe tittar man i första hand på de ytliga venerna i armbågsvecket. Av dessa är de vener som finns i mitten av vecket de mest lämpliga, det vill säga vena mediana cubiti och vena cephalica, på grund av att de är stora, ytliga vener som ofta är synliga. På detta område är dessutom risken att punktera en artär eller nerv liten. Om lämplig ven inte hittas i armbågsvecket kan även vener på handryggen användas. I figur 4 presenteras vener på handryggen och i armbågsvecket (Skov-Poulsen, 2015; Tuokko, et.al., 2008, s. 42 – 44; Matikainen, et.al., 2010, s. 65-66).



Figur 4. Vener för blodprovstagning i armbågsvecket och på handryggen. (Vårdhandboken, 2015)

Det är dock viktigt att undvika venpunktion från ärriga, brännskadade, infekterade och svullna områden. Venpunktion ska även undvikas från en arm med infusion eller dropp, från arm på den sida av kroppen där en mastektomi gjorts, från extremitet som opererats eller gipsats samt från extremitet med någon form av propp (Tuokko, et.al., 2008, s. 42 – 44; Matikainen, et.al., 2010, s. 65 – 66).

Då lämplig ven hittats putsas huden med desinfektionsmedel. Då huden torkat avlägsnas nålens skydd. Venen hålls på plats genom att provtagaren spänner huden med ett finger en bit nedanför punktionsstället. Venen punkteras med nålens öppning vänd uppåt i cirka 30 graders vinkel. Nålen hålls på plats genom att provtagaren stöder sin hand mot patientens arm. Då venen punkterats kan röret föras in i hållaren så att röret börjar fyllas med blod. Så fort röret börjar fyllas med blod bör stasen öppnas. Då röret är fyllt tas det ur hållaren och blandas/vänds 5–10 gånger om det innehåller tillsats och nästa rör kan sättas i hållaren. När sista röret tagits ur hållaren kan nålen dras ur punktionsstället. Provtagaren håller då en kompress redo vid punktionsstället och trycket på då nålen är ute. Provtagaren eller patienten trycker därefter på punktionsstället några minuter för att minska risken för blödning och blåmärke. Provtagaren gör sig därefter av med avfallen enligt lokala anvisningar, tar av sig handskarna och desinfekterar händerna. Provtagaren kontrollerar även att patientens blödning slutat samt att patienten mår bra (Skov-Poulsen, 2015; Tuokko, et.al., 2008, s. 47 – 48; Matikainen, et.al., 2010, s. 70 – 73).

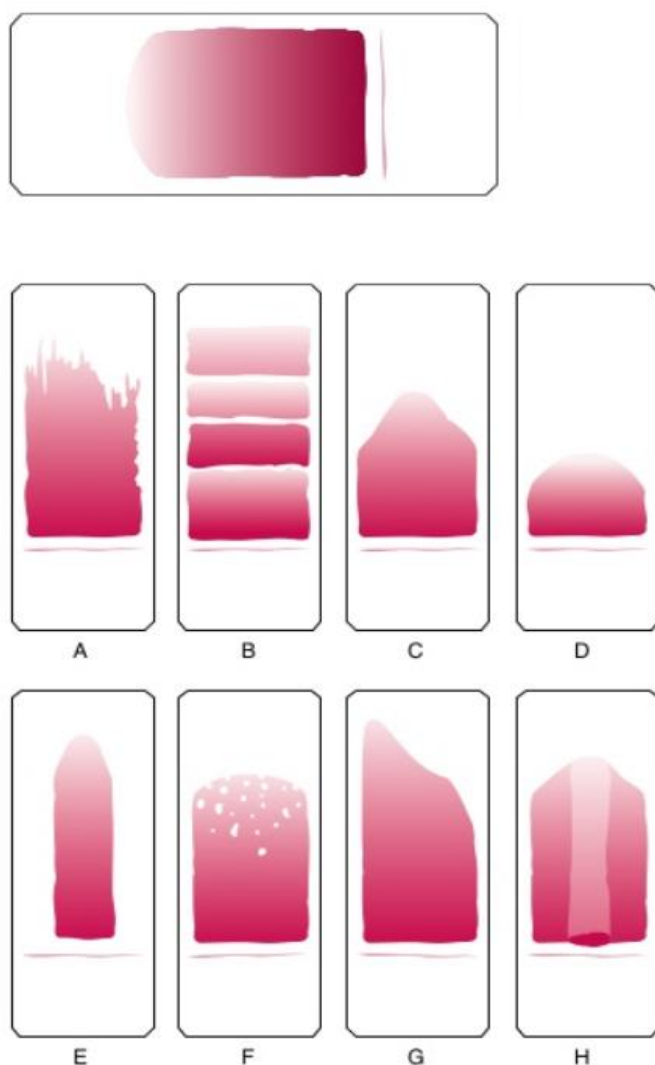
När man vill undersöka helblod tas blodprov i rör som innehåller tillsats som förhindrar koagulering. Vid hematologiska analyser används EDTA-rör som innehåller etylendiamintetraättiksyra, EDTA, som antikoagulan. EDTA binder kalcium i blodet och förhindrar på så sätt koagulering. Av antikoagulanterna bevarar EDTA bäst blodcellernas form och storlek, och därför lämpar sig EDTA-blod bäst för blodcellsräkning (Matikainen, et.al., 2010, s.76).

3.6 Anvisningar för perifert blodutstryk

Vid perifert blodutstryk tas blodprovet i EDTA-rör eller kapillärt direkt från fingertoppen eller från hälen. Blodutstryken ska dras och färgas inom två till tre timmar efter blodprovstagningen för att uppnå bästa kvalitet. Material som behövs för blodutstryk är rena objektglas, gärna av hög kvalitet, att dra ut blodstryket på och ett utstrykningsglas, med slipade kanter för att inte söndra cellerna. Utstrykningsglaset används som verktyg medan man stryker ut blodet på objektglaset. Man droppar en droppe, cirka tre millimeter i diameter, på objektglasets ena ända och sedan tar man utstrykningsglaset och stryker ut droppen i en 30–45-gradig vinkel. När man gör preparatet drar man tillbaka utstrykningsglaset över droppen så att den får sprida ut sig ordentligt, sen för man utstrykningsglaset lugnt och i jämn takt mot andra änden av det liggande objektglaset och så har man ett blodutstryk. Objektglaset lufttorkas omedelbart efter utstrykningen (Rodak & Carr, 2013, s. 2 – 4).

Själva storleken på bloddroppen som man applicerat på glaset har stor betydelse, om man har satt för stor droppe blir utstryket för långt och/eller för tjockt medan utstryket blir för kort och/eller för tunt om man har satt för liten droppe. Även hastigheten man drar ut med spelar roll, drar man för långsamt får man en dålig spridning av leukocyterna genom att man får med sig de större cellerna såsom monocyterna och granulocyterna placerar sig i slutet och i kanterna av utstryket (Rodak & Carr, 2013, s. 2 – 4).

Kriterier för ett bra perifert blodutstryk är: utstryket blod fyller två tredjedelar till tre fjärdedelar av glaset, svansen av utstryket har en fin mjukrund form. De laterala ändorna av utstryket ska vara synliga, på utstryket ska inte finnas hål, oregelbundenheter eller ränder. När man håller upp glaset mot ljus ska svansen av utstryket påminna om en regnbåge och hela bloddroppen ska vara utstruken, se figur 5 (Rodak & Carr, 2013, s. 2 – 4).



Figur 5. Utstryket överst visar ett optimalt utstryk. Utstryk A-H visar oacceptabla utstryk (Rodak & Carr, 2013, s. 2 – 4).

Färgning av perifert blodutstryk görs för att kunna identifiera blodcellerna och kunna hitta morfologiska celler lättare med hjälp av mikroskop. Det finns olika färgningsmetoder, de vanligaste metoderna för blodutstryk är Wright eller Wright-Giemsa. Dessa metoder innehåller både eosin och metylenblå färg och kallas därför polykroma färgningar. Cellerna fixeras vid glaset med hjälp av metanol som finns i färgningsserien. Den metylenblåa färgen är basisk och färgar sura cellkomponenter blåa, såsom RNA. Eosinfärg är sur och färgar basiska cellkomponenter röda, såsom hemoglobin och eosinofilt granula. Under färgningen spelar pH en viktig roll, det är vid pH 6,4 den egentliga färgningen av cellkomponenterna sker (Rodak & Carr, 2013, s. 2 – 4).

Vid Vasa centralsjukhus används färgningsmetoden May-Grünwald Giemsa (MGG) (Ruhanainen, R., 2013). May-Grünwald innehåller färgerna eosin och metylenblått samt 85-procentig metanol, vid denna färgningsetapp färgas cellernas cytoplasma och granula. Giemsa innehåller färgerna azuerosin och metylenblått samt 50-procentig metanol och glycerol, vid denna färgningsetapp färgas cellkärnan (Avantor™ Performance Materials., 2012, s.161 – 162).

Ett optimalt färgat glas följer dessa kriterier: de röda blodkropparna ska ha en färg mellan rosa till laxröd, cellkärnan ska ha en lila färg, granulan i cytoplasman hos neutrofila ska ha en färg mellan lavendel till lila, granulan i cytoplasman hos basofila ska ha en färg mellan mörkblå till svart, granulan i cytoplasman hos eosinofila ska ha en färg mellan röd till orange och området mellan cellerna ska vara färglöst, rent och fläcklöst utan färg (Rodak & Carr, 2013, s. 2 – 4).

Vid mikroskopiska räkning av celler är det viktigt att man gör differentialräkningen och identifieringen av cellerna på rätt område av utstryket. Med det differentialräkningsbara området avses området på glaset där erythrocyterna har en fin spridning och lägger sig bredvid varandra, där det är möjligt att identifiera cellerna. Cellerna har en tendens att mista sin ursprungliga form i svansen av utstryket och kan då identifieras fel (Leseve, et.al., 2004, s. 739 – 745; Zini, et.al., 2012, s.107 – 116).

3.7 Den automatiska cellräknaren Sysmex XE-5000

Den automatiska cellräknaren Sysmex XE-5000 (Sysmex) används på kliniska laboratorier för in vitro diagnostik (Sysmex Corporation, 2007, s. 1-1). Vid analys på Sysmex används blod taget i EDTA-rör. Provet bör analyseras inom 4 timmar efter provtagningen, men vid behov kan provet förvaras i kylskåp (Sysmex Corporation, 2007, s. 6 – 12). Sysmex kan analysera upp till 67 parametrar och använder sig av RF/DC-metoden, den hydrodynamiska fokuseringsmetoden, flödescytometrimetoden och SLS-hemoglobin-metoden (Sysmex Corporation, 2007, s. 11-11).

Av RF/DC-metoden ges måttet på blodcellernas storlek och densiteten i cellernas inre såsom kärnans storlek. Detta räknas ut enligt ändringar i likspänningsresistansen respektive den

radiofrekventa resistansen. Av detta fås ett tvådimensionellt fördelningsdiagram över cellstorlek och inre densitet (Sysmex Corporation, 2007, s.11-11).

Den hydrodynamiska fokuseringsmetoden baserar sig på att cellerna i provet som blivit spätt med reagens tvingas att gå en efter en genom öppningen i en linje in till mätzonen. På grund av att cellerna tvingas en och en genom mätzonen och sedan direkt vidare till uppsamlingsröret kan cellerna inte driva tillbaka till mätzonen och på så sätt kan inte samma cell mätas flera gånger. I uppsamlingsröret omges det redan utspädda provet med sheath-reagenset, för att förhindra tillbakaflödet av celler. Detta förbättrar cellräkningens noggrannhet och reproducerbarhet (Sysmex Corporation, 2007, s.11-11).

Flödescytometrimetoden anger blodkropparnas fysiologiska och kemiska egenskaper. Vid flödescytometri passerar partiklarna genom en känslig detekteringspassage där en halvledar-laserstråle separerar cellpopulationen. Metoden mäter det spridda ljuset som ger information om cellens storlek och struktur. Metoden mäter även ljusets våglängd som ger information om koncentrationen av RNA och/eller DNA (Sysmex Corporation, 2007, s.11-12 – 11-13).

SLS-hemoglobinmetoden använder sig av en kombination av cyanmethemoglobinmetoden och oxihemoglobinmetoden för att bestämma hemoglobinhalten. Metoden går ut på att det aspirerade blodet späds med ett reagens som hemolyserar erytrocyterna. Hemoglobinet omvandlas till SLS-hemoglobin som kan mätas vid en våglängd på 555 nm (Sysmex Corporation, 2007, s.11-13 & s. 11-16).

4 Tidigare forskning

Här tar vi upp tidigare studier som handlar om att jämföra automatisk skistocyträkning med manuell. Vi har även lyft fram forskningar som använder sig av annan apparatur än Sysmex för att få en bättre översikt.

4.1 Utvärdering av Sysmex XE-5000 FRC-räkning

Chalvatzi et al. (2013, s.193 – 199) gjorde en studie, där de utvärderade av Sysmex XE-5000:s automatiserade räkning av erythrocytfragment (FRC) samt undersökte om mikrocytos och hypokromi påverkar Sysmex FRC-svar. För att uppnå detta måste de även utvärdera den automatiska cellräknarens FRC-svar jämfört med manuell mikroskopiering.

Skistocytantalet bestämdes genom manuell räkning i mikroskop. 1000 erythrocyter räknades av två hematologer som mikroskopierade oberoende av varandra och använde sig av ICSH:s rekommendationer för skistocyträkning. I den automatiska cellräkningen användes Sysmex XE-5000. De variabler som undersöktes på Sysmex var erythrocytfragment (FRC%), mikrocytos (%MicroR) samt hypokromi (%Hypo-He). Dessa variabler mättes på Sysmex retikulytlokyt kanal. I undersökningen användes 200 perifera blodprov från patienter med sjukdomar som associeras med mikro- och makroangiopati (Chalvatzi, et.al., 2013, s.193 – 199).

För den statistiska analysen användes SPSS. Korrelationen mellan parametrarna analyserades med Pearsons och Spearmans korrelationskoefficient, medan bedömningen av överensstämmelse mellan den manuella och automatiska skistocyträkningen analyserades med Bland-Altman plot (Chalvatzi, et.al., 2013, s.193 – 199).

Resultaten av undersökningen visade att en statistisk signifikant korrelation mellan den automatiska och manuella skistocyträkningen fanns enligt Spearmans korrelationskoefficient. Dock analyserades resultaten även med Bland-Altman plot, som visade på en överskattning på 0,82 % av den automatiska cellräknarens skistocytantal vilket kan leda till falska positiva resultat. Resultatet visade även att mikrocytos inte har någon inverkan på Sysmex skistocytantal, medan en mild hypokromi påverkar antalet (Chalvatzi et.al., 2013, s.193 – 199).

4.2 Forskning om bedömning av skistocyter med automatiska blodcellsräknare

Leseve et al. (2012, s. 566 – 576) gjorde en studie som undersökte en automatisk cellräknarens mätning av erythrocytfragment (FRC), som en möjlig parameter för att utesluta förekomsten av skistocyter i blodutstryket och därmed också utesluta trombotisk mikroangiopati (TMA). Deras främsta mål var att bedöma det prediktiva värdet för den nya parametern FRC, vilket undersöktes genom att jämföra det automatiserade och det manuella antalet av FRC/skistocyter (Leseve, et.al., 2012, s. 566 – 576).

Under 10 år samlades perifera blodprov in i fyra olika centra. Antalet patientprov som samlades översteg 90 000. För analys av dessa användes två automatiska cellräknare, ADVIA 120 och Sysmex XE-2100. Dock fanns inga kvalitetskontroller eller standarder tillgängliga för mätning av FRC. Den manuella skistocyträkningen utfördes enligt rekommendationer från French Group of Cellular Hematology, Italian Research Center in Automated Methods in Hematology och ICSH. Man observerade 1000 erythrocyter i de perifera blodutstryken. Statistiska analyser gjordes för att hitta falsk negativa/positiva värden, samt att man fick fram ett gränsvärde för när FRC% utlöses (Leseve, et.al., 2012, s. 566 – 576).

Resultatet av studien visar att deras studie är en värdefull metod för att korrekt utesluta förekomsten av skistocyter vid blodutstryk, och därmed även utesluta en TMA diagnos. Man kom även fram till att ett FRC-värde $> 0,5 \%$ ansågs vara avvikande för båda analysatorerna. De såg även ett samband mellan överskattning av FRC% och patienter diagnostiserade med TMA, på grund av förekomsten av mikrosfärocyter och ospecifika erythrocytfragment. ADVIA överskattade skistocyt mängden med $0,4\text{--}0,5 \%$ och Sysmex med $0,75\text{--}0,82 \%$. Sysmex hade även en tendens att öka överskattningen med stigande skistocytantal (Leseve, et.al., 2012, s. 566 – 576).

4.3 Bedömning av skistocyter med den automatiska cellräknaren AVIDA jämfört med manuell mikroskopering

Leseve et al. (2004, s.739 – 740) har gjort en studie om möjligheten att använda en automatisk cellräknare för direktmätning av skistocyter istället för manuell räkning av skistocyter

från blodutstryk under mikroskop. De har jämfört den automatiska cellräknaren ADVIA 120 (Bayer Health Care, Tarrytown, NY) resultat med erfarna bedömare och teknikers manuella räknings resultat av skistocyter. Under studien var identifieringen av skistocyter svår eftersom deras bestämda form för att uppnå kriterierna för att räknas till skistocyt var ännu under diskussion. ADVIA 120 var även den första automatiska cellräknaren som gav möjlighet att direkt mäta antalet erythrocyter med morfologiska avvikelser och erythrocyt fragment i ett blodprov. För att bekräfta närvaron av skistocyter behövs dock alltid en mikroskopisk granskning av blodutstryk.

I studiens början jämförde Leseve et al. (2004, s.739 – 741) manuella resultat av skistocyt-räkning med mikroskop av blodutstryk med den automatiska cellräknaren ADVIA 120s resultat. Senare blev studien mer klinisk orienterad till att jämföra automatisk cellräkning av skistocyter vid närvaro eller frånvaro av trombocytsjukdomar. Detta eftersom man hittat ett samband mellan graden av trombocytopeni och prognosen för trombotisk mikroangiopati (TMA). De studerade även sambandet mellan antalet trombocyter och närvaron av skistocyter och det visade sig att man vid trombocytsjukdomar ofta hade skistocyter i blodet.

I studien användes 131 blodprover tagna i EDTA-rör, dessa av patienter med misstänkt TMA eller med dysfungerande hjärtklaffar. De har räknat skistocyterna med två olika metoder. Ena metoden var att räkna skistocyterna manuellt från blodutstryk färgade med May-Günwald Giemsa under mikroskop. Vid den optiska studien av blodutstryken användes GFHC:s (French Groupe of Cellular Hematology) kriterier och rekommendationer: 1000 erythrocyter räknades i differentialräkningsbart område. Det som räknades till skistocyter var triangel- eller hjälmformade celler. De som valdes att mikroskopera hade olika kunskapsnivåer, en var specialiserad laboratorieskötare, en vanlig laboratorieskötare, en biologistuderande, en allmän biolog och en erfaren bedömare (detta var Leseve J-F). Den andra metoden var att mäta blodprovet på analysatorn AVIDA 120 och ta skistocytresultatet från mätkanalen för erythrocyter och trombocyter (Leseve, et.al., 2004, s. 740).

Överensstämmelsen mellan de olika observatörerna mättes därefter statistiskt genom ICC (interclass correlation coefficient) och grafiskt genom Bland-Altman metoden. Sensitiviteten och specificiteten av resultaten från analysatorn räknades ut genom sanna och falskt positiva resultat, för denna uträkning stod expertens manuella räkningsresultat som referens med ett godkänt positivt kast på 0,2 %. Sensitiviteten för detektion av skistocyter var 100 % medan specificiteten var låg och var 20 % (Leseve, et.al., 2004, s.739 – 740).

Överensstämmelsen var utmärkt mellan observatörerna, $ICCC > 0,8$. Eftersom denna överensstämmelse var så hög kom man även fram till att det är möjligt att arbeta ut en standard över hur man räknar skistocyter under mikroskop. Överensstämmelsen mellan observatörernas medelresultat och AVIDA 120 låg på $ICCC = 0,7274$ utav detta fick man fram att analysatorn hade en trend att ge för höga resultat (i medeltal $+0,445\%$). Observatörerna hittade vid 12 utstryk flera skistocyter än vad analysatorn gett som resultat. Med hjälp av jämförelsen mellan analysator och observatörerna fick man fram att analysatorns skistocytresultat som var över $0,25\%$ var positiva resultat och resultat under $0,25\%$ var negativa (Leseve, et.al., 2004, s. 740 – 743).

5 Material och metoder

I detta kapitel behandlas metoder för undersökning, datainsamling och dataanalys. Respondenterna behandlar även olika kvalitetsparametrarna som ligger grund för den kliniska laborieverksamheten.

5.1 Metoder för undersökningen

Vid en inledd undersökning klargörs det om undersökningen är kvalitativ metod eller kvantitativ metod. Metoden som väljs är den som är mest relevant i samband med undersökningens syfte. En kvalitativ metod används när det finns ett behov att undersöka fenomen och få tillgång till beskrivande data. Medan den kvantitativa metoden baserar sig på den tidigare forskningen. Vid användningen av en kvantitativ metod är oftast forskningsprocessen planerad, strukturerad och resultaten sedan analyseras och presenteras statistiskt samt att själva studien genomförs empiriskt (Olsson & Sörensen, 2011, s. 96, 106 – 108). Respondenternas undersökning har baserat sig på den kvantitativa metoden.

5.2 Metoder för datainsamling

Vid val av datainsamlingsmetod bör man först ha fastställt syfte och frågeställningar. Utifrån dessa kan man avgöra val av insamlingsmetod samt mängden och typen av material som bör insamlas (Patel & Davidsson, 2011, s. 69). I denna studie har respondenterna använt sig av både teoretisk och empirisk datainsamling. Den teoretiska datainsamlingen gjordes med hjälp av arbetsbeskrivningar från Vasa centralsjukhus laboratorium, manual för analysinstrumentet och böcker men främst användes elektroniska databaser för att hitta den nyaste vetenskapliga forskningen. Informationen som hittades användes främst till den teoretiska bakgrunden men även till andra delar av denna undersökning. Den empiriska datainsamlingen gjordes på Vasa centralsjukhus laboratorium men även i laboratorieutrymmen på Yrkeshögskolan Novia, Campus Seriegatan (se kapitel 6.1 Undersökningens praktiska genomförande och 6.2 Mikroskopering av skistocyter). Den empiriska datainsamlingen presenterades med hjälp av en tabell (se bilaga 1 Tabell över rådata)

5.3 Metoder för dataanalys

Varje ny metod bör valideras innan den börjar användas i laboratoriets rutinarbete. För att kunna validera metoden görs en rad olika experiment. Ett av dessa experiment är en metodjämförelse. Metodjämförelsen görs mellan den nya metoden och en jämförelsemetod som används i det dagliga rutinarbetet på laboratoriet. Detta bör göras för att få reda på överensstämmelsen och den eventuella systematiska skillnaden mellan metoderna. En metodjämförelse behövs även för att kunna lita på att den kvantitativa mätningen är pålitlig och reproducerbar för att i fortsättningen kunna använda den nya metoden i rutinarbetet med riktiga patientprov. För metodjämförelse har statistiska analyser utvecklats, bland annat Bland-Altman plot och Passing-Bablok regressionsanalys, som ofta används inom laboratoriet (Giarina, 2015, s.141 – 142; Bilic-Zulle, 2011, s.49 – 50).

5.3.1 Passing-Bablok regressionsanalys

Passing-Bablok är en regressionsanalys som används för att statistiskt visa enigheten mellan analysmetoder, men även för att ge en uppfattning om möjliga systematiska fel mellan dem. När man jämför mätmetoder förväntar man sig att korrelationen metoderna emellan är hög, gärna 0,99 eller högre. Vid jämförelse av metoder används ofta en linjär regressionsmodell för att kunna tolka resultaten. Ofta rekommenderas Passing-Bablok för dessa ändamål. Den stora fördelen med Passing-Bablok regressionsanalys är den är en icke-parametrisk metod. Detta betyder att man inte behöver ta hänsyn till möjliga extremvärden (Bilic–Zulle, 2011, s. 50).

Passing-Bablok åskådliggör resultatet med hjälp av ett spridningsdiagram, regressionslinje och regressionsekvation. Regressionsekvationen lyder: $y = a + bx$, där a står för linjens skärningspunkt eller intercept, b står för regressionslinjens lutning eller slope och x står för en observation av endera metoden. Skärningspunktens värde visar de konstanta skillnaderna och lutningskoefficienten visar de proportionella skillnaderna då konfidensintervallet är 95 % (Bilic–Zulle, 2011, s. 50).

Ett konfidensintervall på 95 % förklarar om skärningspunktens värde skiljer sig från noll (0) och om linjens lutningskoefficient skiljer sig från värdet ett (1) bara av en slump. Om konfidensintervallet för skärningspunkten innehåller värdet noll (0), kan man dra en slutsats att det inte finns någon konstant skillnad metoderna emellan. Om konfidensintervallet för lutningskoefficienten innehåller värdet ett (1), kan man dra slutsatsen att det inte finns någon proportionell skillnad metoderna emellan. I sådana fall skulle man kunna dra slutsatsen att det inte finns någon skillnad mellan metoderna, alltså $x=y$, och metoderna kunde användas omväxlande (Bilic–Zulle, 2011, s. 50).

5.3.2 Bland-Altman plot

Bland-Altman plot är en så kallad grafisk metod och med hjälp av denna analyserar man samstämmigheten mellan två olika metoder genom jämförelse av den insamlade datan. Vid användning av linjär regression beskrivs endast ett linjärt samband mellan två eller flera

variabler, därför är Bland-Altman plot ett bättre val som kan förklara bättre om två metoder skiljer sig åt (R-Statistics, 2008).

Bland-Altman plot används för att mellan olika metoder undersöka systematiska (bias) och slumpmässiga avvikelser. Detta för att få fram den verkliga nivån av det som mäts. Genom att använda denna metod får man information om relationen mellan koncentration och skillnad, som kan vara användbart om det finns problem hos analysinstrumentet vid specifika gränser. Diagrammet som fås av Bland-Altman plot visar skillnaden mellan medelvärdet och de två mätmetoderna. Man får även fram om skillnaderna är oberoende av koncentrationen eller ökar proportionellt med koncentrationerna (Linnet & Boyd, 2008, s.215).

Diagrammet som fås vid Bland-Altman visar att skillnaden mellan två kvantitativa mätmetoder, detta visas på y-axeln, och på x-axeln visas skillnaden som är beroende av den verkliga nivån (Björk, 2010, s. 274). De horisontella linjerna blir dragna vid den genomsnittliga avvikelsen och vid gränserna för den genomsnittliga skillnaden $\pm 1,96$ gånger skillnaden för standardavvikelsen (SD) (MedCalc Software, 2013). Standardavvikelsen anger måttet för den genomsnittliga avvikelsen från medelvärdet (Björk, 2010, s. 60).

Bland-Altman plot analysmetoden räknar alltså ut ett gränsvärde av 95 % och den genomsnittliga skillnaden mellan två kvantitativa mätmetoder, vilket ger att standardavvikelsen i genomsnitt är en skillnad på $\pm 1,96$. Man förväntar sig att inom gränsvärdet på 95 % håller sig 95 % av skillnaderna mellan de olika mätmetoderna (Myles & Cui, 2007, s. 309).

5.3.3 Kappakoefficient

Kappakoefficient (kappa) används när man jämför två olika metoder som mäter samma fenomen. Med kappa får man ett mått på om de två mätmetodernas överensstämmelse beror på slumpen eller inte. Till att börja med räknas en kvot ut, som kallas *index of validity*, som ger ett värde på metodernas överensstämmelse. Kvoten ligger mellan noll (0) och ett (1), och ju närmare ett (1) kvoten är desto bättre överensstämmelse har metoderna. Kvoten räknas enligt formeln nedan. Nedan ses även tabell 1 som kan användas vid beräkning av kappakoefficient (Viera & Garrett, 2005, s. 360 – 363).

$$\text{Index of Validity} = P_0 = (a+d)/n$$

Tabell 1. Exempel på en räknetabell för beräkning av kappakoefficient.

Räknemodell för kappakoefficient			
	Positiv	Negativ	Summa
Positiv	a	b	s0
Negativ	c	d	s1
Summa	m0	m1	n

(Viera & Garrett, 2005, s. 360 – 363).

Därefter räknas den förväntade överensstämmelsen ut genom att först räkna ut det förväntade antalet fall där metoderna får ett positivt utfall, och sedan det förväntade antalet fall där metoderna får ett negativt utfall. Dessa tal adderas och man får ett värde på den förväntade överensstämmelsen. Detta beskrivs med formeln nedan (Viera & Garrett, 2005, s. 360 – 363).

$$\text{Förväntad överensstämmelse} = P_c = [(s1/n) * (m1/n)] + [(s0/n) * (m0/n)]$$

För att räkna ut själva kappakoefficienten subtraheras index of validity med den förväntade överensstämmelsen. Det teoretiskt bästa tänkbara indexet (oftast värdet ett (1)) subtraheras sedan med den förväntade överensstämmelsen. Värdet av dessa två differenser divideras. Se formel nedan (Viera & Garrett, 2005, s. 360 – 363).

$$\text{Kappakoefficient} = (P_0 - P_c) / (1 - P_c)$$

Kappakoefficienten är alltid mindre eller lika med ett (1). I sällsynta fall kan kappa även vara negativt. Ju närmare ett (1) kappa ligger, desto bättre stämmer metoderna överens. Se tabell 2 nedan för värderingen av kappakoefficienten (Viera & Garrett, 2005, s. 360 – 363).

Tabell 2. En tabell för värderingen av kappakoefficienten.

Värdering av kappakoefficient	
Kappakoefficient	Överensstämmelsen styrka
<0,20	Ingen eller mycket svag
0,21 - 0,40	Svag
0,41 – 0,60	Hyfsad
0,61 – 0,80	God
0,81 – 1,00	Mycket god

(Viera & Garrett, 2005, s. 360 – 363).

Kappakoefficienten fungerar bäst om antalet positiva och negativ utfall är ungefär lika och är beroende av förhållandet mellan positiva och negativa utfall. Om antalet utfall är ojämna kan det ge en besvärlig kappa. För att ge en komplett bild av metodernas överensstämmelse kan sensitivitet, specificitet, positivt prediktivt värde (PPV) och negativt prediktivt värde (NPV) användas som hjälpmedel för att tolka dataanalysen (Viera & Garrett, 2005, s. 360 – 363).

5.4 Kvalitetsparametrar

För att säkerställa att laboratoriesvaren uppnår högsta möjliga kvalitet finns olika krav på kvalitetsparametrar vid ett kliniskt laboratorium. Det finns både interna och externa kvalitetskontroller. Interna är när laboratoriet själv har ett system för att hitta fel i mätningarna. Externa är när laboratoriet deltar i ett system för att jämföra mätningarnas riktighet. I Finland finns till exempel Labquality som är ett externkontrollsystem som sänder ut kvalitetskontrollprover kontinuerligt för analyser som finns vid ett laboratorium för att jämföra analysresultatens riktighet mellan olika laboratorium (Nilsson-Ehle et.al., 2012, s. 19 – 20). Respondenterna tar upp i detta kapittel en del av kvalitetsaspekterna som tillämpas vid laboratorier.

5.4.1 Mätfel och Mätosäkerhet

Alla mätningar som görs på ett laboratorium har någon form av mätfel och mätosäkerhet. Därför bör resultaten som fås aldrig uppfattas som det riktigt sanna värdet. När man tar i bruk nya metoder på ett laboratorium ingår det i kvalitetsarbetet att fastställa mätosäkerheten (Ganrot & Tryding, 2003, s. 24 – 26).

Mätfel förklaras som skillnaden mellan det erhållna värdet och det sanna värdet. Det finns två typer av mätfel. Det finns två typer av mätfel, slumpmässiga och systematiska mätfel. Det slumpmässiga mätfelet sker oberoende av vilken typ av observation som görs. Det systematiska mätfelet beror till exempel på felaktigheter i mätmetoden eller mätutrustningen (Ganrot & Tryding, 2003, s. 24 – 26).

Mätosäkerheten är en följd av mätfel och slumpmässig variation, men kan även bero på mänskliga misstag. Mätosäkerheten brukar anges med hjälp av statistiska mått och kan uppskattas till exempel genom att utföra upprepade mätningar av prover. Man eftersträvar ofta att mätosäkerheten ska vara mindre än hälften av den biologiska variationen mellan individer (Ganrot & Tryding, 2003, s. 24 – 26).

5.4.2 Precision, repeterbarhet och reproducerbarhet

Precisionen är beroende av de tillfälliga felen som kan uppstå under en mätning. Dessa kallas variationer eller standardavvikelse och kan endast göras med begränsad noggrannhet. Precisionen är mycket beroende av personen som utför mätningen och av apparaturen som används. Den precisionen visar är analysresultatens fördelning kring medelvärdet, inte om mätningen ligger nära eller långt ifrån det sanna värdet. Därför kan precisionen endast bestämmas när yttre faktorer inte har någon inverkan på mätinstrumentet. Repeterbarheten är den bestämda precisionen, och berättar om mätningar som har använt samma metod och utförts under samma förhållanden (metod, apparatur, upprepning under en viss tid, person och procedur). Medan man med reproducerbarhet syftar till precisionen när mätningens förutsättning ändras på ett eller annat sätt till exempel när olika personer utför mätningen eller vid byte av analysmetod. Stämmer resultaten väl överens vid upprepade mätningar under samma

förhållanden är repeterbarheten god och om resultaten stämmer väl överens vid upprepade mätningar gjorda under lite olika förhållanden med till exempel olika instrument och av olika personer är reproducerbarheten god (Simonsen 2005, s. 32 – 33).

5.4.3 Sensitivitet och specificitet ur mätteknisk och diagnostisk synvinkel

När man bestämmer en mätmetods prestanda kan man ange den mättekniska sensitiviteten och specificiteten. Med mätteknisk sensitivitet menar man ändringen i mätmetodens ”signal” när en ändring av komponenternas koncentration skett. Medan man med mätteknisk specificitet menar mätmetodens kunskap att endast mäta den specifikt avsedda komponenten. En metod är alltid en avvägning mellan sensitiviteten och specificiteten (Nilsson-Ehle, et.al., 2012, s. 18 – 19).

Diagnostisk sensitivitet och specificitet används mellan laboratorium och den kliniska enheten som beskrivning av analysmetodernas egenskaper för att ge en patient rätt diagnos. Den diagnostiska sensitiviteten kan definieras som frekvensen av de sanna positiva resultaten bland patienterna och den diagnostiska specificiteten kan definieras som frekvensen av de sanna negativa resultaten bland referensgruppen. Till exempel om en analysmetod har 100 % sensitivitet och 90 % specificitet betyder detta att analysmetoden identifierar 100 % av patienter som har sjukdomen och 90 % av de patienter som inte har sjukdomen kan uteslutas medan 10 % av patienterna får falskt positivt resultat (Nilsson-Ehle, et.al., 2012, s. 45 – 47).

6 Undersökningens genomförande

Den praktiska delen av undersökningen genomfördes 13.4–29.5.2015 vid yrkeshögskolan Novias laboratorieutrymmen, campus Seriegatan. Det praktiska utförande gick ut på att under denna tid mikroskopera prover som samlats in vid Vasa centralsjukhus kliniska laboratoriet.

6.1 Undersökningens praktiska genomförande

Proverna som användes samlades in på kliniska laboratoriet vid Vasa centralsjukhus för analys av liten blodbild och retikulocyter (B-PVK+retik) eller fullständig blodbild (B-TVK) på den automatiska cellräknaren Sysmex XE-5000. De prover som respondenterna intresserade sig för var de som hade mätts på retikulocytkanalerna och hade gett höga och låga värden på FRC%. Personalen på laboratoriet tog sig an uppgiften att samla in prov med varierande FRC%. Av dessa gjordes blodutstryk som färgades enligt standardiserade metoder för differentialräkning. Insamlingen av proverna pågick under cirka sex månader.

Respondenterna började det praktiska arbetet med att ta reda på vilka kriterier en erytrocyt bör uppfylla för att räknas som en skistocyt, detta för att kunna utarbeta en arbetsbeskrivning att använda sig av vid den manuella mikroskoperingen. Det här gjordes genom att söka information bland annat i böcker och vetenskapliga artiklar. Den nyaste och mest relevanta vetenskapliga artikeln var utformad av International Council for Standardization in Haematology (ICSH). Denna artikel behandlade identifikation, kvantifikation och diagnostiska värden av skistocyter (se kapitel 5.2). Utifrån denna artikel utarbetades kriterier som användes vid mikroskoperingen (se bilaga 2).

Då respondenterna påbörjade mikroskoperingen granskade de några glas tillsammans med handledaren och läraren i hematologi Margareta Antus för att kontrollera att rätt celler faktiskt räknades. Under detta skede upptäcktes att den mikroskoperade skistocytprocenten skiljde sig avsevärt från den automatiska cellräknarens FRC%. Respondenterna bestämde sig därför i enighet med handledaren om att räkna skistocyter både enligt ICSH:s kriterier och enligt den gamla uppfattningen om vad som är en skistocyt. I äldre litteratur anges

skistocyter som erythrocyter med en oändlig variation i form, vilket omfattar oregelbundna förvrängda erythrocyter, erythrocytskuggor och bisarra former (Zini, et.al., 2011, s.107 – 116). Detta kändes även relevant eftersom det saknades information om exakt vilka celler den automatiska cellräknaren Sysmex XE-5000 bedömer som skistocyter (se kapitel 5.3). Respondenterna mikroskopade kontinuerligt glas gemensamt för att garantera att mikroskoperingen överensstämde.

Respondenterna har självständigt mikroskoperat varje patientprov oberoende av varandra, för att få ett tillförlitligt svar som motsvarar verkligheten i rutinarbetet på laboratoriet. Vid mikroskoperingen var respondenterna även omedvetna om den automatiska cellräknaren Sysmex XE-5000:s resultat för FRC%. Respondenterna mikroskopade allt som allt 68 prov, och varje patientprov tilldelades nya provnummer från ett till 68. Respondenterna utförde till att börja med en utstrykskontroll för att kontrollera att utstryken uppfyllde kriterierna för ett bra blodutstryk (se kapitel 3.6) samt utförde räkningen på ett differentialbart område av blodutstryket (se kapitel 3.6 & 6.2). Respondenterna kontrollerade 68 utstryk. Av dessa utstryk uppfyllde 65 kriterierna för ett bra blodutstryk. Sammanlagt mikroskopades 65 patientprov. Under arbetets gång ifylldes en Exceltabell med respondenternas och Sysmexs resultat som senare användes till den statistiska analysen (se bilaga 1 Tabell över rådata).

Efter att mikroskoperingen var klar tog respondenterna kontakt med handledare och kemist Jukka Salminen på Vasa Centralsjukhus. Salminen föreslog användning av Bland-Altman plot, Passing-Bablok regressionsanalys och Kappakoefficient för den statistiska analysen.

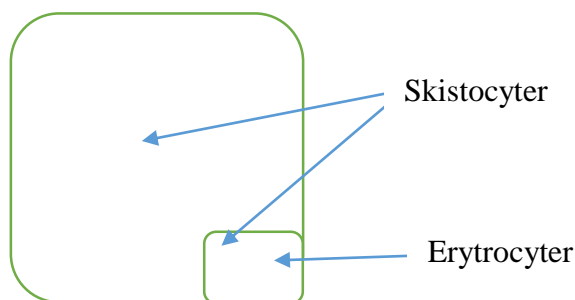
6.2 Mikroskopering av skistocyter

Enligt Zini et al. (2012, s.107 – 116) bör man räkna åtminstone 1000 erythrocyter i det differentialräkningsbara området, och även skistocyter i dessa synfält för att få en skistocytpromcent. Eftersom examensarbetet är ett beställningsarbete från Vasa centralsjukhus valde respondenterna att använda sig av deras arbetsbeskrivning, 8368 E-Fragm, för skistocyträkning (se bilaga 3). Enligt denna används Miller-okular, se figur 6, som respondenterna fick låna från Vasa centralsjukhus laboratorium och från yrkeshögskolan Novias laboratorieutrymmen. Detta är ett okular med två kvadrater i synfältet, en stor kvadrat som innehåller en mindre. I den mindre kvadraten räknas endast erythrocyter, medan skistocyter räknas i hela

den större och mindre kvadraten. Enligt arbetsbeskrivningen ska minst 120 erythrocyter räknas, dock valde respondenterna att räkna minst 200 erythrocyter för att få ett tillförlitligare svar. Respondenterna använde sig av 100 gångers förstoring och immersionsolja. Svaren fås enligt följande:

$$(\text{mängden skistocyter/mängden erythrocyter}) \times 10 = \text{skistocytprocent (\%)}$$

Vid mikroskopisk räkning av skistocyter är det viktigt att man håller sig på det differential-



Figur 6. Synfält med Millerokular

räkningsbara området eftersom detta påverkar identifieringen av cellerna. Det är viktigt att man inte mikroskoperar på varken för tunt område nära svansen eller på för tjockt område där man inte kan identifiera cellerna. Erythrocyterna ska ha en fin spridning och inte ligga ovanpå varandra. Andra som även kan påverka är variabiliteten är till exempel skillnader i räkningsmetoden, räknad erythrocytmängd och användningen av hjälpmedel såsom Millero-kular. Erythrocyterna har en tendens att mista sin ursprungliga form i svansen av utstryket och kan då räknas till fel grupp. Även de triangelformade skistocyterna har en tendens att bli runda mot svansen (Leseve, et.al., 2004, s. 739 – 745; Zini, et.al., 2012, s.107 – 116).

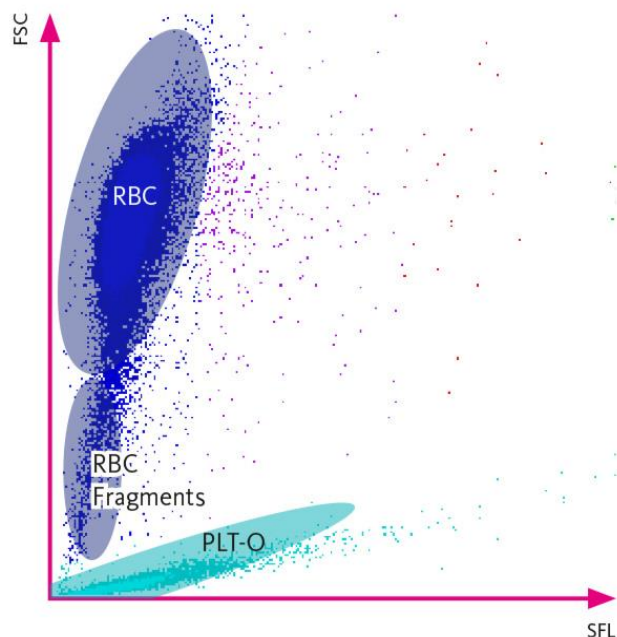
Skillnaden i räknat antal skistocyter mellan observatörerna vid manuell mikroskopering har även en tendens att variera, fastän mikroskoperingen skett av samma glas (Abe, et.al., 2009, s. 257 – 262). Variabiliteten mellan morfologisk tolkning är stor mellan olika laboratorier och observatörer. Eftersom det ännu saknas standardisering av skistocyternas morfologiska kriterier kan detta leda till inkonsekvent diagnostik information och därav påverka behandlingen och den kliniska vården (Zini, et.al., 2012, s. 107 – 116; Leseve, et.al., 2007, s. 149 – 151). Skistocyter bör alltid dokumenteras vid differentialcellräkning om skistocyterna är den dominant erythrocytavvikelsen i utstryket (Zini, et. al., 2012, s. 107 – 116).

6.3 Sysmex XE-5000 FRC%

För att få större insikt i hur Sysmex XE-5000 klassificerar celler till FRC% sände respondenterna e-post till Martti Kuusela (personlig kommunikation, 21.4.2015) på Roche Diagnostics Oy. Respondenterna undrade hur Sysmex XE-5000 räknar skisto-cyter/erythrocytfragment. Kuusela gav svaret att Sysmex XE-5000s parameter FRC% inte i detta skede är en svarsparameter (Measurement parameter) utan endast en undersökningsparameter (Research-parameter). Sysmex XE-5000 använder därmed parametern främst för att alarmera om prov med hög FRC%, vilket kan ses som flaggor i Sysmex dataprogram. Eftersom parametern inte är en svarsparameter kan svaret inte ges ut utan kontrollräkning i mikroskop.

Respondenterna intresserade sig därefter för skillnader mellan svars- och undersökningsparametrar. Kuusela (personlig kommunikation, 7.7.2015) förklarade detta med att endast svarsparametrarna förflyttas vidare från datorn i apparaten (IPU) till dataprogrammet med kriterier (SIS), och därmed kan den automatiska cellräknarens resultat ges direkt till beställande enhet. Undersökningsparametrars resultat kan inte ges ut eftersom att dessa saknar kvalitetskontroller och resultatets tillförlitlighet kan ifrågasättas. Diagnostiskt sett finns inte i nuläget behov av parametern FRC%, eftersom läkare inte är medvetna om parametern eller hur den kunde användas vid behandling. En annan orsak kan även vara att referensvärden fortfarande är osäkra. Ofta utvecklas undersökningsparametrar till svarsparametrar om efterfrågan finns samt behov vid patientens behandling. Även Sysmex Europe GmbH (2015) bekräftar att FRC% endast är en undersökningsparameter som inte bör användas i in vitro diagnostik.

För att räkna ut FRC% använder sig Sysmex i retikulocytkanalerna med fluorescerande flödescytometri. Med hjälp av denna metod avbildar Sysmex ett tvådimensionellt fördelningsdiagram (scattergram). Varje cell avbildas på scattergrammet baserat på sidofluorescensens intensitet, som beskriver cellens RNA innehåll, och det framåtspridna ljusets intensitet, som beskriver cellens storlek. FRC kan ses under RBC-populationen i scattergrammet enligt figur 7 (Sysmex Europe GmbH, 2015; Chalvatzi, et.al., 2013, s. 193 – 199).



Figur 7. RET-kanalens scattergram (Sysmex Europe GmbH, 2015).

I RET-kanalen används två fluorescerande färgningar (RET-SEARCH (II) reagens). Dessa färgningar penetrerar cellens membran och färgar DNA och RNA i leukocyter och RNA i erythrocyter och trombocyter. Retikulocyterna kan skiljas från mogna erythrocyter på grund av deras skillnad i RNA. För att skistocyter ska placeras i området för FRC i scattergrammet, krävs att dessa avvikande erythrocyter ska ha låg sidofluorescerande intensitet och låg intensitet av det framåtspridna ljuset. Skistocyter är alltid mindre än intakta erythrocyter och innehåller mindre RNA (Abe, et.al., 2009, s.257 – 262; Chalvatzi, et.al., 2013, s. 193 – 199).

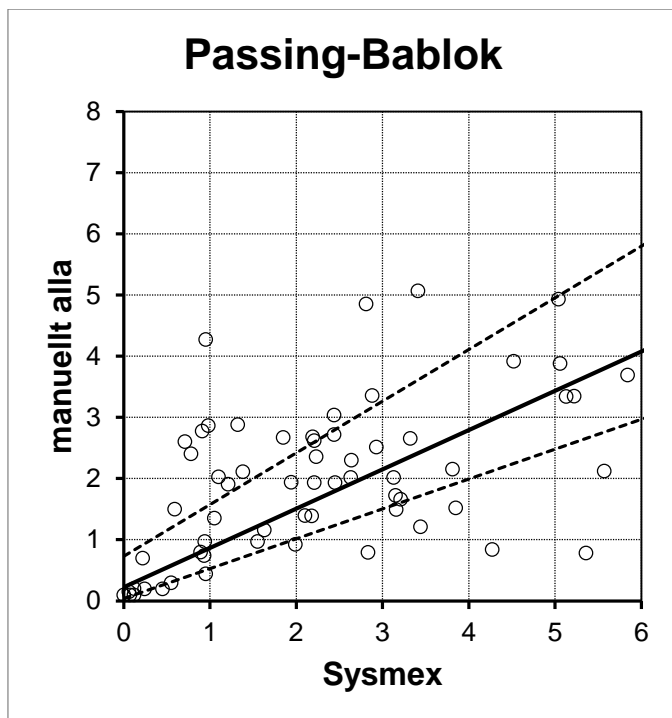
Man bör alltid kontrollera MCH-värdet när man analyserar FRC%, eftersom mycket lågt MCH-värde kan leda till en ökning av icke-fragmenterade erythrocyter i scattergrammets område för FRC. Detta kan leda till falska positiva svar för skistocyter (Abe, et.al., 2009, s. 257 – 262; Chalvatzi, et.al., 2013, s. 193 – 199).

7 Resultat redovisning och tolkning

Vid den statistiska analysen framkom att Sysmex XE-5000 har en tendens att överskatta antalet skistocyter. Ju högre resultatet på FRC% Sysmex blev desto större variation blev det mellan apparatens svar och respondenternas mikroskopbedömda svar.

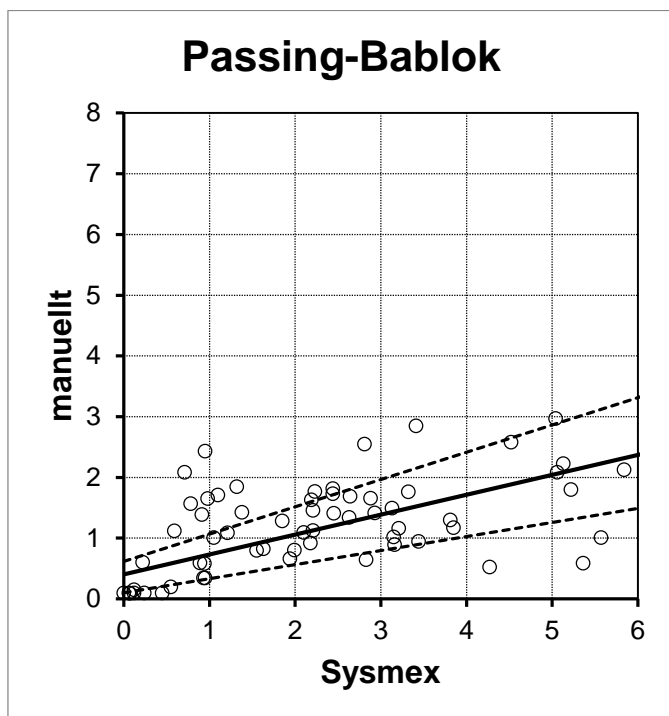
7.1 Tolkning med hjälp av Passing-Bablok regressionsanalys

Regressionslinjens ekvation som fås vid Passing-Babloks regressionsanalys lyder $y = a + bx$. Eftersom respondenterna räknat skistocyter enligt ICSH:s kriterier men även enligt den gamla uppfattningen om att alla deformerade erythrocyter räknas, har två diagram skapats. I dessa fall står y för värden som erhållits med den manuella mikroskoperingen, x står för värden som erhållits av Sysmex, a står för interceptvärdet och b för linjens lutning. Resultaten presenteras med hjälp av diagram i figur 8 och 9.



Figur 8. Passing-Bablok regressionsanalys mellan Sysmex och den manuella mikroskoperingen av alla skistocytformer

Ekvationen för ovanstående regression i figur 8 lyder $y = 0,22 + 0,64x$. Konfidensintervallet 95 % för interceptpunkten 0,22 är 0,04-0,73, värdet noll (0) är alltså inte inkluderat i konfidensintervallet. Konfidensintervallet 95 % för linjens lutning 0,64 är 0,49-0,84, värdet ett (1) är alltså inte inkluderat i konfidensintervallet. Detta betyder att det finns en konstant och proportionell skillnad mellan metoderna.

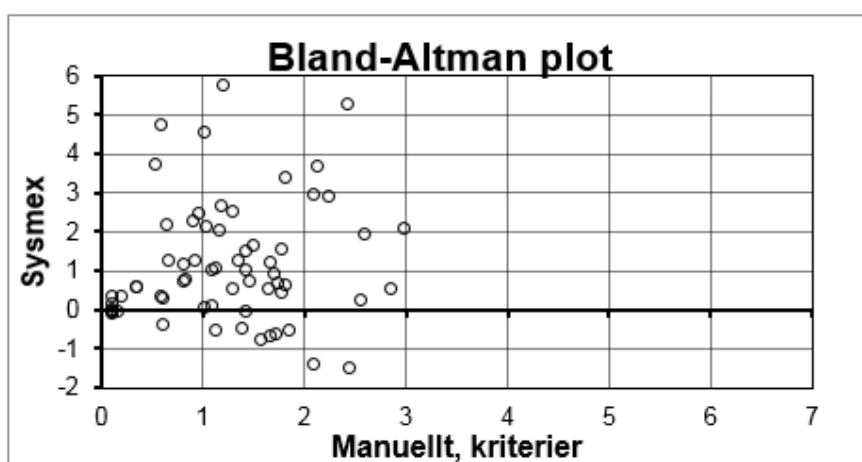


Figur 9. Passing-Bablok regressionsanalys mellan Sysmex och den manuella mikroskoperingen enligt ICSH:s kriterier för skistocyter

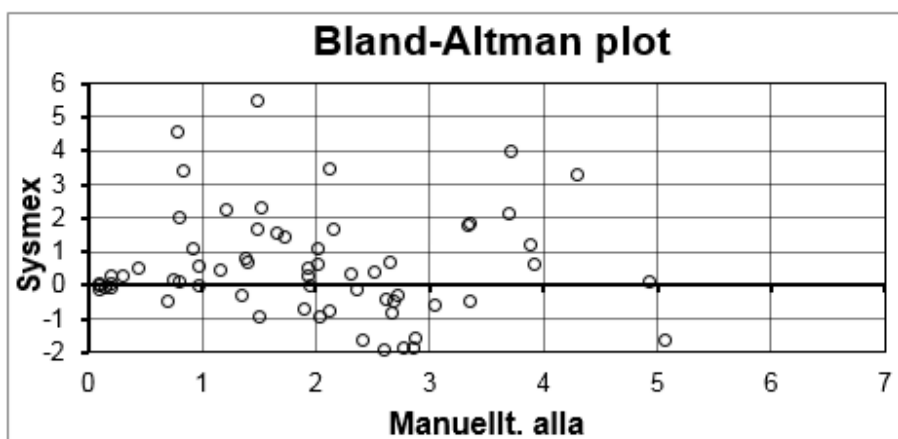
Ekvationen för ovanstående regression i figur 9 lyder $y = 0,40 + 0,33x$. Konfidensintervallet 95 % för interceptpunkten 0,40 är 0,23-0,45, värdet noll (0) är alltså inte inkluderat i konfidensintervallet. Konfidensintervallet 95 % för linjens lutning 0,33 är 0,10-0,62, värdet ett (1) är alltså inte inkluderat i konfidensintervallet. Detta betyder att det finns en konstant och proportionell skillnad mellan metoderna. Av denna analys fick respondenterna inte ut tillräckligt med information och valde därför att fortsätta analysera data med ytterligare dataanalysmetoder för att få ett användbart resultat.

7.2 Tolkning med hjälp av Bland-Altman plot

Vid användning av statistiska analysmetoden Bland-Altman plot får man fram variationen mellan två analysmetoder. Här nedan presenteras den statistiska analysen med hjälp av den grafiska dataanalysmetoden Bland-Altman plot för respondenternas studie. När respondenterna räknade både efter ISCH's kriterier och använt sig av den gamla uppfattningen av vad som är en skistocyt har två diagram gjorts upp. Figur 10 visar analysdiagrammet för Sysmex vs skistocyträkning enligt ISCH' kriterier medan figur 11 visar analysdiagrammet för Sysmex vs skistocyträkning enligt den gamla uppfattningen.



Figur 10. Bland-Altman plot diagram mellan Sysmex och den manuella mikroskoperingen enligt ICSH:s kriterier för skistocyter.



Figur 11. Bland-Altman plot diagram mellan Sysmex och den manuella mikroskoperingen av alla skistocytformer.

Som kan ses är punkterna för diagrammen mycket utspridda, vilket betyder att de analysmetoder som används har stor variation mellan varandra. Detta tyder på att användning av denna statistiska dataanalysmetod inte riktigt passar i detta fall då analysmetoderna skiljer sig så mycket från varandra och valde därför att fortsätta analysera data med ytterligare dataanalysmetoder för att få ett användbart resultat.

7.3 Tolkning med hjälp av Kappakoefficient

Med hjälp av kappakoefficient fick respondenterna fram tabell 3 (se nedan). I denna tabell har ett gränsvärde på 0,5 använts för att skilja på så kallade negativa och positiva prov. Detta betyder att prov med en skistocytprocent under 0,5 % har klassats som negativa och prov med en skistocytprocent som är lika med eller över 0,5 % har klassats som positiva. Denna gräns bestämdes med hjälp av Chalvatzi et al. (2012, s. 193-199) och Leseve et al. (2011, s. 343-356). I dessa studier framkommer att 0,5 % används som ett övre referensvärde och att en skistocyt mängd över 0,5 % anses vara patologisk. I tabellens vänstra kolumner finns *S* som står för Sysmex och i de övre kolumnerna står *M* för manuell mikroskopering. I denna tabell kan ses att 65 prov körts sammanlagt. Vid sju (7) prov har både den manuella mikroskoperingen och Sysmex gett ett värde på under 0,5 % och vid 55 prov har både den manuella mikroskoperingen och Sysmex gett ett värde över 0,5 %. Redan av detta kan man dra slutsatsen att den manuella mikroskoperingen och Sysmex stämmer väl överens vid användning av ett gränsvärde på 0,5 %.

Tabell 3. Tabell för uträkning av kappakoefficient.

	M < 0,5	M ≥ 0,5	Summa
S < 0,5	7	1	8
S ≥ 0,5	2	55	57
Summa	9	56	65

För att analysera kappas räknades först index of validity ut. I detta fall blev kvoten 0,95 ($P0=(7+55)/65$). Detta betyder att metoderna har god överensstämmelse sinsemellan, ef-

tersom ju närmare ett (1) kvoten ligger desto bättre överensstämmelse har metoderna. Därefter räknades den förväntade överensstämmelsen ut, som blev 0,77 ($P_c = [(57/65) * (56/65)] + [(8/65) * (9/65)]$). För att kunna räkna ut kappakoefficienten användes dessa två värden. Kappakoefficienten blev 0,80 $[(0,95 - 0,77) / (1 - 0,77)]$. Ju närmare värdet ett (1) kappa ligger, desto bättre stämmer metoderna överens. Enligt tabell 2 tyder detta på en god överensstämmelse.

Kompletterande räknades även sensitiviteten, som låg på 0,98, och specificiteten, som låg på 0,78, ut. Även NPV, som låg på 0,88, och PPV, som låg på 0,96, räknades ut. Detta betyder att sannolikheten för att de negativa värdena verkligen är negativa är 88 %, och att sannolikheten för att de positiva värdena verkligen är positiva är 96 %. Dessa värden är utmärkta. Av detta kan respondenterna dra slutsatsen att Sysmex kan användas för att sälla bort negativa patientprov. Positiva patientprov bör ändå kontrolleras i mikroskop eftersom Sysmex har en tendens att överskatta antalet.

8 Kritisk granskning och diskussion

Idén till examensarbetet uppstod när en läkare vid Vasa centralsjukhus var intresserad av skistocytprocenten hos en patient. Detta väckte intresse hos laboratoriepersonalen och en ny arbetsbeskrivning arbetades ut 2014 men undersökningen har inte ännu tagits i bruk. Då man planerar att ta in en undersökning i undersökningssortimentet krävs att den nya metoden undersöks och jämförs med en metod som redan används. Det krävs även att man säkerställer att metoden går att lita på. Intressant i denna studie är att en klar referensmetod saknas och därför har respondenterna behandlat den manuella mikroskoperingen som referensmetod, vilket även den tidigare vetenskapliga forskningen använt. Respondenternas studie kan användas som en vägvisare i utvecklingen av den nya undersökningen E-fragm vid Vasa centralsjukhus.

Eftersom räkning av skistocyter inte är en del av rutinarbetet vid Vasa centralsjukhus sände respondenterna e-post till några större laboratorier i Finland för att få en bättre överblick om de använder sig av denna undersökning överhuvudtaget samt vilka kriterier och metoder de använder sig av vid manuella mikroskopräkningen av skistocyter. Respondenterna valde att

sända e-post till Åbo universitets centralsjukhus laboratorium (TYKS), Tammerfors universitets centralsjukhus laboratorium (Fimlab) och Helsingfors och Nylands sjukvårdsdistrikts laboratorium (HUS). Respondenterna fick endast svar från ett av laboratorierna. Tomi Koski, överläkare för hematologi, vid Fimlab gav oss svaret att de endast ibland räknar skistocyter i samband med undersökningen B – Morfo om fragmentationsgraden är begärt. Detta görs alltid av läkare. Oftast används Miller okular i detta sammanhang. Vid Fimlab har de ibland kontrollerat skistocytprocenten när Sysmex alarmerar om detta, men det tillhör inte rutinarbetet. Dock menar Koski att om det görs en manuell mikroskopering första gången Sysmex alarmerar kunde man använda Sysmex:s FRC% i uppföljnings syfte för patienten. Koski bad även respondenterna att sända den färdiga studien, vilket visar att det även finns intresse för denna typ av studie vid andra laboratorium.

Respondenterna hade väldigt liten förkunskap kring skistocyter i början av studien. Under tiden för examensarbetet insåg respondenterna hur stort och komplext område det rörde sig om. Ett krav som ofta ställs på forskning är att studien ska ha ett pragmatiskt värde, vilket betyder att det ska finnas en nytta med forskningen. Respondenterna anser att det finns stor nytta med studien. De har framfört stor kunskap och kartlagt den stora variationen i området. Respondenterna har behandlat allt från uppkomsten, utseendet, och kriterier för en skistocyt samt betydelsen av skistocyter för människan.

Vid insamlingen av patientprover och provresultat antar respondenterna att provtagaren/laboratorieskötaren har följt de preanalytiska riktlinjerna, vilket betyder att provtagaren gjort sitt bästa för att utesluta att provhantering och apparathantering har inverkat på resultatet. Detta kan inte säkerställas då respondenterna varken tagit proverna själva eller övervakat provtagningen eller analysen.

Antalet patientprover som undersöktes blev sammanlagt 65 stycken. Antalet patientprover som undersöktes var inte optimalt, och ett större antal skulle ha ökat undersökningens tillförlitlighet. Ett större antal skulle även ha gett en mer verklighetsbaserad överblick. Respondenterna anser att mikroskoperingen av skistocyter tog längre tid än väntat och det ledde därför till det låga antalet undersökta patientprover.

Under forskningsperioden kom respondenterna fram till att forskningen skulle varit mer pålitlig om patientprovet hade körts på endast en av analysatorerna. Dessutom borde patientproverna ha körts två gånger för att säkerställa Sysmex resultat. Bristande i denna undersökning är att respondenterna inte vet vilken av de två befintliga Sysmex analysatorerna som används i rutinarbetet patientproverna är körda på. Detta betyder att Sysmex resultat för

FRC% kan variera något då man aldrig kan garantera ett exakt överensstämmande resultat mellan analysatorerna.

För Sysmex saknas även kontroller och kalibratorer för undersökningsparametrar, såsom FRC%. Detta beror på att Sysmex ännu inte utvecklat kanalen till en mätkanal och på grund av att standardisering av FRC% fortfarande är bristfällig. Detta betyder även att Sysmex inte utvecklat några kontroller eller kalibratorer för FRC%. Det leder i sin tur till att respondenterna inte kan vara säkra på att Sysmex värde för FRC% motsvarar patientens verkliga värde.

Personalen vid Vasa centralsjukhus laboratorium hade till en början endast samlat in patientprover med hög FRC%. Efter överläggning kom respondenterna i samråd med kemist Jukka Salminen fram till att även låga, så kallade negativa patientprov, bör tas med i undersökningen. Dessa behövs för ett mer verklighetsbaserat och trovärdigt resultat för undersökningen. Detta ledde till att respondenterna mikroskoperade patientprover ännu i examensarbetets slutskede, men även till att antalet patientprover med låg FRC% blev få till antalet och därför inte motsvarar verkligheten där största delen av patientproverna är negativa. Det låga antalet negativa patientprover kan även ha spelat en stor roll i uträkningen av kappakoefficienten. Detta kan ha gett oss en högre kappakoefficient än vad som motsvarar verkligheten.

I ICSH, och i de flesta andra vetenskapliga artiklar som har behandlats i detta examensarbete, har de i sin metodbeskrivning mikroskoperat minst 1000 erythrocyter per utstryk. Respondenterna valde däremot att räkna enligt Vasa centralsjukhus arbetsbeskrivning (se bilaga 3) och räknade därför endast cirka 200 erythrocyter per utstryk. Enligt Leseve et al. (2007, s. 149) är standardavvikelsen (SD) 0-3% för en teoretisk skistocytprocent på 1 om 500 erythrocyter räknats, 0-2 % om 1000 erythrocyter räknats och endast 0,8-1,2 % när 10 000 erythrocyter räknats per utstryk. Detta bevisar att ett högre antal erythrocyter borde ha räknats per utstryk för att få mer tillförlitliga svar.

Respondenterna har en del äldre vetenskapliga källor som behandlats i detta examensarbete och antalet finländska källor är få. Respondenterna har valt att använda de äldre källorna eftersom att forskningen om skistocyter har gått långsamt framåt och informationen i dessa skiljer sig inte mycket från den nyaste forskningen inom samma ämne. Bristen på finländska källor beror helt enkelt på att man forskat väldigt lite inom detta ämne i Finland.

I den tidigare forskningen (kapitel 4) kom både Leseve, et al. (2012, s. 566 – 576) och Chaltvati et al. (2013, s.193 – 199) i sina studier fram till resultatet att Sysmex har en tendens att överskatta skistocyt mängden, vilket även respondenterna drog som slutsats i deras studie.

Dock hade Chalvatzi et al. (2013, s.193 – 199) kommit fram till sitt resultat med hjälp av dataanalysmetoden Bland-Altman plot, vilket inte gav resultat i respondenternas undersökning. Detta antar respondenterna berodde på Chalvatzi et al. (2013, s.193 – 199) hade större antal prov i studien.

Respondenterna anser att studien gett svar på de givna frågeställningarna. Frågeställningen ”Vilka kriterier bör en erytrocyt uppfylla för att bedömas som en skistocyt enligt internationella kriterier?” ges svar på i kapitel 3.2 och bilaga 2. Respondenterna använde sig av forskningsresultat som finns tillgängliga i nuläget för att besvara frågeställningen. Främst användes ICSH:s kriterier som grund för att kartlägga kriterierna för en skistocyt i studien.

I kapitel 6.3 ges svar på frågeställningen ”Vilka kriterier har den automatiska cellräknaren Sysmex XE-5000 för att en erytrocyt skall räknas som en skistocyt?”. Svaret på denna frågeställning hittades i den automatiska cellräknaren Sysmex anvisningar samt från några vetenskapliga studier. Dock fanns det svårigheter att hitta svar på denna frågeställning, eftersom vetenskapliga artiklar har en tendens att endast flyktigt tangera den specifika analysmetoden för FRC%. Respondenterna kunde inte hitta svar på denna frågeställning i den automatiska cellräknaren Sysmex manual, eftersom FRC% endast är en undersökningsparameter i nuläget.

Respondenternas sista frågeställning ”Kan mikroskopisk bedömning av skistocyter i perifert blodutstryk ersättas av resultatet från den automatiska cellräknaren Sysmex XE-5000 för räkning av skistocyter?” ges svar på i resultatredovisningen i kapitel 7. Respondenterna använde sig av statistiska metoder för att få svar på frågeställningen. Enligt de statistiska analyserna kan Sysmex användas för att sälla bort så kallade negativa prov med en skistocytprocent (FRC%) under 0,5 men så kallade positiva prov med en skistocytprocent (FRC%) över 0,5 bör alltid kontrolleras med manuell mikroskopering.

Litteraturförteckning

Abe, Y., Wada, H., Yamada, E., Noda, M., Ikejiri, M., Nishoika, J., Kobayashi, T., Matsumoto, T., Masuya, M., Isaji, S., Uzui, M., Uemoto, S., Katayama, N. & Nobori, T., 2009. The effectiveness of measuring for fragmented red cells using an automated hematology analyser in patients with thrombotic microangiopathy. *Clinical and applied thrombosis/hemostasis*, 15(3), s. 257 – 262.

Avantor™ Performance Materials,, 2012. *Product Information May-Grünwald Giemsa*. USA: u.o.

Bilic-Zulle, L., 2011. Comparison of methods: Passing and Bablok regression. *Biochemia Medica*. 21(1), s. 49 – 52.

Björk, J. (2010). *Praktisk statistik för medicin och hälsa*. Stockholm: Liber AB.

Bölenius, K., 2014. *Improving venous blood specimen collection practices. Method development and evaluation of an educational intervention program*. Umeå: Doktorsavhandling för Department of Nursing och Department of Medical Biosciences. Umeå Universitet.

Chalvatzi, K., Spiroglou, A., Nikolaidou, A. & Diza, E., 2013. Evaluation of fragmented red cell (FRC) counting using Sysmex XE-5000 – Does hypochromia play a role?. *International Journal of Laboratory Hematology*, 35, s. 193 – 199.

Gahrton, G. & Juliusson, G. red., 2012. *Blodets sjukdomar lärobok i hematologi*. Lund: Studentlitteratur.

Ganrot, P O. & Tryding, N. (2003) Kliniska laboratorieundersökningar. Ingår i: Nilsson- Ehle, P (red). *Laurells klinisk kemi i praktisk medicin*. (8:nde uppl.). Lund: Studentlitteratur AB.

Giavarina, D., 2015. Understanding Bland Altman analysis. *Biochemia Medica*. 25(2), s.141 – 151.

Harmening, D. & Jones, K.W. eds, 2009. *Clinical hematology and fundamentals of hemostasis*. Philadelphia: F.A. Davis Co.

Hoffbrand, A.V. & Moss, P.A.H., 2011. *Essential Hematology* (6). Singapore: Markono Print Media Pte Ltd.

- Huh, H.J., Chung, J.W., & Chae, S.L., 2013. Microscopic schistocyte determination according to International Council for Standardization in Hematology recommendations in various diseases. . *International Journal of Laboratory Hematology*, 35, s. 542 – 547.
- Kuusela, M., 2015. Personlig kommunikation (e-post) [21.4.2015-7.7.2015]
- Leseve, J-F., Alla, F., Dugue, F., Clément, L., Lecompte, T. & Bordigoni, P., 2011. valuation of schistocyte monitoring after haematopoietic stem cell transplation. *Intertational journal of laboratory hematology*, 33, s. 343 – 356.
- Leseve, J-F., Asnafi, V., Braun, F. & Zini, G., 2012. Fragmented red blood cells automated measurement is a useful parameter to exclude schistocytes on the blood film. *International Journal of Laboratory Hematology*, 34, s. 566 – 576.
- Leseve, J-F., Salignac, S., Alla, F., Defente, M., Benbih, M., Bordigoni, P. & Lecompte, T., 2004. Comperative evaluation of schistocyte counting by an automated method and by microscopic determination. *American Society for Clinical Pathology*, 2004(121), s. 739 – 745.
- Leseve, J-F., Salignac, S. & Lecompete, T., 2007. Letter to the Editor: Laboratory measurement of schistocytes. *International Journal of Laboratory Hematology*, 29, s. 149 – 151.
- Linnet, K. & Boyd, J.C. (2008). Selection and Analytical Evaluation of Methods With Statistical Techniques. In: Bruns, D.E. Bustis, C.A. Ashwood, E.R (ed). *Tietz- Fundamentals of Clinical Chemistry* (6:th ed.) Missouri: Saunders.
- Matikainen, A., Miettinen, M. & Wasström, K., 2010. *Näytteenottajan käsikirja*. Helsinki: Edita Prima Oy
- Myles, P.S. & Cui, J. (2007). Using the Bland-Altman method to measure agreement with repeated measures. [Online] <http://bj.a.oxfordjournals.org/content/99/3/309.full> [hämtat: 19.10.2015]
- Narayanan, S., 2000. The Preanalytical Phase. An Important Component of Laboratory medicine. *American Journal of Clinical Pathology*, 113 (3), 429 – 452.
- Nilsson-Ehle, P.N., Berggren Söderlund, M. & Theodorsson, E., 2012. *Laurells klinisk kemi i praktisk medicin*. Lund: Studentlitteratur.

- Olsson, H. & Sörensen, S., 2011. *Forskningsprocessen- Kvalitativa och kvantitativa perspektiv*. Stockholm: Liber AB.
- Patel, R. & Davidson, B., 2011. *Forskningsmetodikens grunder- Att planera, genomföra och rapportera en undersökning*. Lund: Studentlitteratur AB.
- Peate, I. & Nair, M., 2015. *Anatomy and Physiology for Nurses at a Glance*. West Sussex: John Wiley & Sons, Ltd.
- Rahman, W., Abdullah, W., Mustaffa, R., Ahmed, S., Hassan, M. & Husin, A., 2013. Thrombotic Thrombocytopenic Purpura: Three Peripartum Cases and Diagnostic Challenges. *Clinical Medicine Insights: Case Reports*, 6, s. 141 – 146.
- Rodak, B.F. & Carr, J.H. eds., 2013. *Clinical Hematology Atlas*. St. Louis: Elsevier Saunders.
- Ruhanainen, R., 2013. Vasa centralsjukhus; Instruktioner för laboratorieundersökning. *B-Leukosytit, erittelylaskenta (2225 B – Diffi)*. [Online] <http://www.vshp.fi/med-serv/klkemi/fi/ohjekirja/2225.htm> [hämtat: 22.10.2015]
- R-Statistics. (2008). Bland-Altman. [Online] <http://rstats.tiddlyspot.com/#Bland-Altman> [hämtat: 19.10.2015]
- Sand, O., Sjaastad, Ø., Haug, E. & Bjålie, J., 2006. *Människokroppen*. Stockholm: Lieber AB.
- Simonsen, F., 2005. *Analysteknik- Instrument och metoder*. Lund: Studentlitteratur AB.
- Sinisalo, M. & Koski, T., 2010. Mitä kertoo verenkuva?. *Suomen Lääkärilehti*, 65(36), s. 2857 – 2859.
- Skov-Poulsen, K., 2015. *Tillvägagångssätt, Blodprov, venös provtagning*. [Online] <http://www.vardhandboken.se/Texter/Blodprov-venos-provtagning/Tillvagagangssatt> [hämtat: 14.9.2015].
- Sysmex Corporation, 2007. *Automatisk hematologianalysator XE-5000 Bruksanvisning*. Japan: Kobe.
- Sysmex Europe GmbH, 2015. *Fragmented red blood cells (FRC*)*. [Online] <http://www.sysmex-europe.com/academy/knowledge-centre/sysmex-parameters/fragmented-red-blood-cells-frc.html> [hämtat: 6.10.2015]

Tortora, G.J. & Derrickson, B. 2012. *Principles of anatomy & physiology (13th Edition)*. USA: John Wiley & Sons, Inc.

Tuokko, S., Rautajoki, A. & Lehto, L., 2008. *Kliiniset laboratorionäytteet – opas näytteiden ottoon varten*. Helsingfors: Tammi.

Viera, A.J. & Garrett, J.M., 2005. Understanding Interobserver Agreement: The Kappa Statistic. *Family Medicine*, 37(5), s. 360 – 363.

Vieregge, G.B., Harrington, T.J., Andrews, D.M., Carpintero, M.F., Green, D.F. & Nayer, A., 2013. *Catastrophic antiphospholipid syndrome with severe acute thrombotic microangiopathy and hemorrhagic complications*. [Online] <http://www.hindawi.com/journals/crim/2013/915309/> [hämtat 22.9.2015] Hindawi Publishing Corporation.

Zini, G., Onofrio, G., Briggs, C., Erber, W., Jou, J.M., Lee, S.H., McFadden, S., Vives-Corrons, J.L., Yutaka, N., & Lesesve, J.F., 2012. ISCH recommendations for identification, diagnostic value, and quantitation of schistocytes. *International Journal of Laboratory Hematology*, 34, s. 107 – 116.

ID	Sysmex FRC%	Manu- ellt	Skillnad
60	0,00	0,10	-0,10
62	0,06	0,15	-0,09
63	0,07	0,10	-0,03
58	0,12	0,10	0,02
61	0,12	0,20	-0,08
36	0,22	0,70	-0,48
64	0,24	0,20	0,04
55	0,45	0,20	0,25
65	0,55	0,30	0,25
44	0,59	1,50	-0,91
33	0,71	2,61	-1,90
25	0,78	2,41	-1,63
59	0,89	0,80	0,09
23	0,91	2,78	-1,87
56	0,93	0,74	0,19
54	0,94	0,97	-0,03
57	0,95	0,44	0,51
37	0,95	4,27	-3,32
30	0,98	2,86	-1,88
38	1,05	1,35	-0,30
40	1,10	2,03	-0,93
27	1,21	1,91	-0,70
26	1,32	2,88	-1,56
39	1,38	2,11	-0,73
35	1,55	0,97	0,58
8	1,63	1,16	0,47
2	1,85	2,67	-0,82
45	1,94	1,94	0,00
46	1,99	0,92	1,07
17	2,10	1,39	0,71
53	2,18	1,39	0,79
32	2,19	2,68	-0,49
12	2,21	1,93	0,28

5	2,21	2,62	-0,41
34	2,23	2,36	-0,13
9	2,44	2,72	-0,28
49	2,44	3,04	-0,60
14	2,45	1,93	0,52
31	2,63	2,02	0,61
47	2,64	2,30	0,34
6	2,81	4,85	-2,04
28	2,83	0,80	2,03
29	2,88	3,36	-0,48
16	2,93	2,51	0,42
7	3,13	2,02	1,11
19	3,15	1,72	1,43
20	3,16	1,49	1,67
22	3,21	1,66	1,55
21	3,32	2,65	0,67
3	3,41	5,07	-1,66
43	3,44	1,21	2,23
15	3,81	2,16	1,65
41	3,85	1,52	2,33
51	4,27	0,84	3,43
11	4,52	3,92	0,60
4	5,04	4,93	0,11
24	5,06	3,88	1,18
50	5,13	3,34	1,79
10	5,22	3,35	1,87
42	5,36	0,78	4,58
52	5,57	2,12	3,45
48	5,84	3,69	2,15
1	6,99	1,49	5,50
13	7,59	4,30	3,29
18	7,72	3,72	4,00

Mikroskopisk skistocyträkning

Skistocyter kan beskrivas som erythrocyter med avvikande former och dessa är alltid mindre än intakta erythrocyter. De kan även beskrivas som cirkulerande fragment av erythrocyter eller erythrocyter som mist delar av sitt cytoplasma. International Council for Standardization in Hematology (ICSH) har utformat rekommendationer för mikroskopiering av skistocyter. Enligt ICSH räknas följande fragment: Dock räknas mikrosfärocyter endast om föregående skistocytformer kan observeras (Zini, et al., 2012, s.109-110).

- **triangelformade erythrocyter,**
- **hjälmformade erythrocyter (helmet cells) med en amputerad zon,**
- **halvmåneformade små erythrocyter (microcrescents),**
- **keratocyter, celler med horn (upp till 3)**
- **Mikrosfärocyter (endast vid närvaro av triangelformade & keratocyter)**

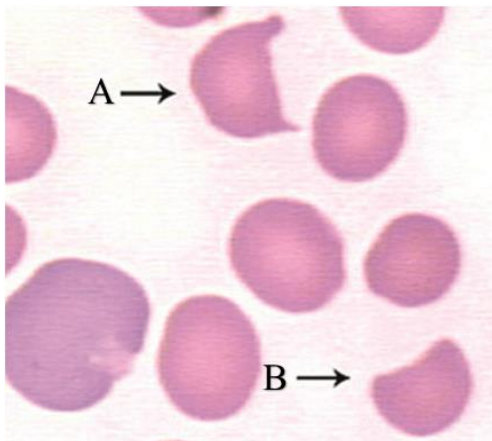
Se exempel på dessa nedan.

Räkning av skistocyter

- Använd Miller okular, lilla rutans storlek är 1/10 av den stora rutan.
- Räkna alla skistocyter i stora rutan samt i lilla rutan.
- Räkna i lilla rutan endast erythrocyter, enligt standard
- Fortsätt räkningen tills du räknat åtminstone 120 erythrocyter eller mer.

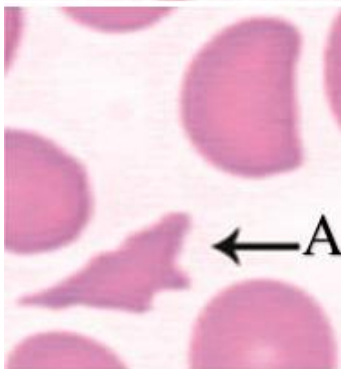
Räkna ut svaret enligt följade:

$(\text{Mängd skistocyter/mängd erythrocyter}) \times 10 = \text{Skistocytsvaret i \%}$.

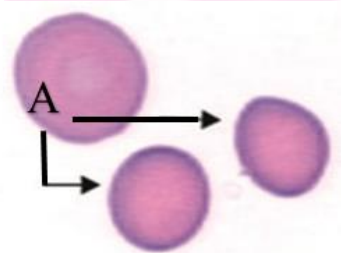


A: en keratocyt

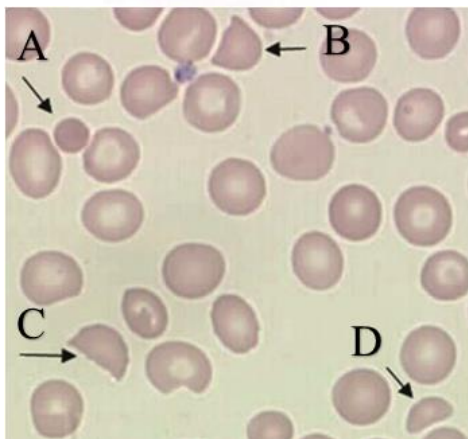
B: en helmetcell



A: en triangulär skistocyt



A: två mikrosfärocyter



A: mikrosfärocyt

B: keratocyt

C: helmetcell

D: halvmåneformad

8368 E – Fragg, Punasolujen fragmentaatioaste

16.1014 RAR

Tutkimuksen indikaationa on **fragmentaatiohemolyysin** epäily.

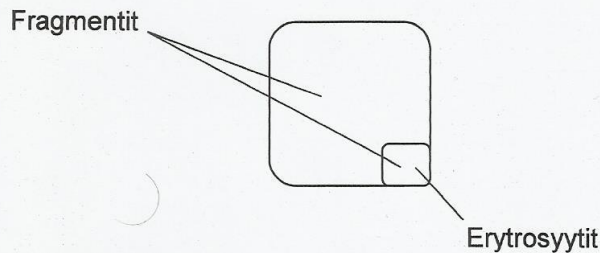
Punasolufragmentit määritetään mikroskoipoimalla MGG-värijätty diffilasi.

Laskentaan käytetään mikroskooppia (Leitz), joka on varustettu **Millerin okulaarilla**.

Millerin okulaarissa on sisäkkäin kaksi neliötä, pieni ja suuri.

Vaihda mikroskoopin toinen okulaari Millerin okulaariin, ja pidä toisen silmän puolella samantyyppinen okulaari ilman Miller-ruudukkoa (Periplan x 10/18-okulaari)

Näet silloin ison ruudun, jonka sisällä on pienempi ruutu. Pienen ruudun pinta-ala on 1/10 ison ruudun pinta-alasta.



Laske yhtä aikaa :

- 1) Kaikki ison ja pienen ruudun fragmentit sekä
- 2) Pienen ruudun erytrosyytit, tavanomaisia laskusääntöjä noudattaen.

Jatka, kunnes olet laskenut 120 eryä tai enemmän.

Laskusuoritus:

(Punasolufragmenttien määrä / Erytrosyyttien määrä) x 10 = fragmentaatioaste %

Esimerkiksi jos eryjä oli 133 ja fragmetteja oli 20 .

$$(20 / 133) \times 10 = 1,5 \%$$

Viitearvot < 0,3 % normaali tulos

1-2 % viitteellinen

>2 % vahva fragmentaatiohemolyysin epäily

Fragmentaatiohemolyysi johtuu yleensä vaurioituneessa mikroverenkierron tapahtuvasta punasolujen mekaanisesta rikkoutumisesta, jota tavataan mm. DIC:ssa, TTP:ssa, HUS:ssa, raskausmyrkytyksessä, karsinooman metastasoinnissa, vaskuliiteissa, munuaisen verenkiertoa tuhoavissa sairauksissa, sydämen läppävioissa, kokokehosädetyksen ja joidenkin lääkkeiden jälkeen. Fragmentaatioastetta voidaan arvioida mikroskooppisesti laskemalla fragmenttien osuus kaikista punasoluista MGG-värijätystä veren sivelyvalmisteesta. Normaalisti punasolufragmentteja tavataan hyvin vähän tai ei ollenkaan (58 terveen henkilön otoksessa kaikilla fragmenttien osuus oli <0.3%). Löydös on jossain määrin viitteellinen fragmentaatiohemolyysiin, mikäli punasolufragmenttien osuus punasoluista on 1-2%. Tulokset yli 2% viittaavat vahvasti fragmentaatiohemolyysiin. Tulosten tulkinnassa on huomioitava, että punasolujen lieväasteista fragmentaatiota esiintyy monessa hematologisessa sairaudessa kuten talassemiaassa, synnynnäisessä elliptosytoosissa, megaloblastisessa anemiassa ja kroonisessa raudanpuuteanemiassa. Fragmentaatio ei näissä tapauksissa johdu vaurioituneesta mikroverenkierron tutkimus ole tarkoitettu näiden tilojen seurantaan.